FACULTÉ DE MÉDECINE DE TOULOUSE

ANNÉE 1970 N° 179

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

EMILIE HETFLEIS

née le 1er Décembre 1940 à BOURRAN (Lot-et-Garonne)

Présentée et soutenue publiquement, le :

LES RÉACTIONS CYTOCHIMIQUES EN PRATIQUE HÉMATOLOGIQUE

APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA LIGNÉE LYMPHOIDE

Président : Monsieur Jean DUCOS - Professeur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536520_0049

FACULTÉ DE MÉDECINE DE TOULOUSE

ANNÉE 1970 N° 179

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

EMILIE HETFLEIS

née le 1er Décembre 1940 à Bourran (Lot-et-Garonne)

Présentée et soutenue publiquement, le :

LES RÉACTIONS CYTOCHIMIQUES EN PRATIQUE HÉMATOLOGIQUE

APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA LIGNÉE LYMPHOIDE

Président : Monsieur Jean DUCOS - Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen	**M. Lazorthes**
Assesseur (Médecine)	**M. Monnier**
Assesseur (Pharmacie)	**M. Breuillaud**
Doyens honoraires	**MM. Gorse, Calvet, Brustier**
Professeurs honoraires	**MM. Vallois, Tapie, Delas, Riser, Bugnard, Vincent, Morel, Bouisset, Calmettes, Thomas, Lagrot, Dulucq**

SECTION MÉDECINE :

Clinique médicale et cardiologique	**MM. Mériel**
Clinique médicale sud	**Gadrat**
Clinique chirurgicale	**Ficat**
Clinique chirurgicale et Gynécologie	**Fabre Pierre**
Clinique chirurgicale et du Cancer	**Grimoud**
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	**Pasquié**
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique	**Rieunau**
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire	**Enjalbert**
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	**Bazex**
Clinique des maladies des voies urinaires	**Lhez**
Clinique des maladies infectieuses	**N...**
Clinique médicale infantile et puériculture	**Sorel**
Clinique médicale de la première enfance	**Bardier**
Clinique de neuro-chirurgie	**Lazorthes**
Clinique neurologique et psychiatrique	**Géraud**
Clinique obstétricale	**Pontonnier**
Clinique odonto-stomatologique	**Cadenat**
Clinique ophtalmologique	**N...**
Clinique O.R.L. et chirurgie maxillo-faciale	**Calvet**
Clinique de pneumo-phtisiologie	**Delaude**
Clinique rhumatologique	**Ruffie René**
Accouchement et obstétricie sociale	**Jahier**
Anatomie	**Bastide**
Anatomie appliquée	**Poulhes**
Anatomie pathologique	**Fabre Jacques**
Anesthésie et réanimation	**Lareng**
Bactérologie et virologie	**Mme Enjalbert**
Biophysique médicale A	**MM. Auvergnat**
Biophysique médicale B	**Bru**
Chimie biologique	**Vaidiguie Paul**
Electro-radiologie	**Marques**
Embryologie générale	**Broussy Jean**
Hématologie	**Ruffie Jacques**
Histologie	**Bimes**
Hydrologie thérapeutique et climatologie	**Darnaud**
Hygiène et médecine sociale	**Monnier**
Immunologie	**Ducos**
Médecine légale et médecine du travail	**Planques**
Pathologie chirurgicale	**Dambrin**
Pathologie générale et médecine expérimentale	**Sendrail**
Pathologie médicale	**Ribaut**
Physiologie	**Laporte Yves**
Physiologie appliquée et pharmacologie	**Baisset**
Sémiologie et clinique médicale	**Laporte Jacques**
Thérapeutique	**Dardenne**

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Histologie et embryologie	**MM. Guilhem**
Anatomie pathologique	**Bouissou**
Biochimie médicale	**Douste-Blazy**
Histologie et embryologie	**Planel**
Maladies infectieuses	**Armengaud**
Oto-rhino-laryngologie	**Claux**
Pathologie médicale	**Boulard**
Physiologie	**Montastruc**
Physiologie	**Bessou**
Physique médicale	**Commanay**
Pneumo-phtisologie	**Migueres**

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie pathologique	M. Fabre Jean
Bactériologie parasitologie, virologie	Mme Lareng
Biochimie médicale	MM. Valdiguie Pierre
Chirurgie générale	Gédéon
Chirurgie générale	Sarrazin
Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire	Eschapasse
Electro-radiologie	Pons
Electro-radiologie	Roulleau
Médecine générale et thérapeuthique	Bollinelli
Ophtalmologie	Deodati
Pédiatrie	Dalous
Neuro-chirurgie	Espagno Jacques
Médecine générale et thérapeutique	Suc
Pédiatrie	Régnier
Médecine générale	Ribet

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Carcinologie	MM. Estrade
Médecine générale et thérapeutique	Bes
Pathologie expérimentale	Gleizes
Médecine générale	Arlet Jacques
Thérapeutique, réanimation médicale, rééducation fonctionnelle et hydrologie	Salvador M.
Radiologie	Combes Pierre
Pneumo-phtisiologie	Albarede J. L.
Pédiatrie génétique médicale	Rochiccioli P.
Chirurgie générale	Escat Jean
Orthopédie, traumatologie, chirurgie plastique et reconstructive	Costagliola Utheza Guy
Urologie	Pontonnier F.
Histologie, embryologie, cytogénétique	Soleilhavoup J.-P.
Biophysique	Guiraud Robert
Physiologie	Pages Bernard
Parasitologie	Larrouy
Immunologie, hématologie, maladies du sang	Bierme Robert
Anatomie et organogénèse	Juskiewenski S.

AGRÉGÉS

Médecine générale	MM. Calazel
Médecine générale	Rascol
Médecine générale	Le Tallec
Chirurgie générale	Gaubert
Dermato et syphiligraphie	Dupré
Hydrologie	Denard
Médecine légale	Grezes-Rueff
Neurologie et psychiatrie	Gayral
Obstétrique	Espagno Guy
Ophtalmologie	Bec

AGRÉGÉS LIBRES

Chirurgie générale	MM. Souquet
Pathologie chirurgicale	Dieulafe

MAITRE DE CONFÉRENCES ASSOCIÉ

Psychiatrie	M. Laboucarie

SECTION PHARMACIE :

Botanique et cryptogamie	MM. N...
Chimie analytique	Pitet
Toxicologie, hygiène industrielle et hydrologie	Bourbon
Chimie pharmaceutique	Blanc
Microbiologie	Breuillaud
Pharmacie chimique et pharmacodynamie	Caujolle
Pharmacie galénique et matière médicale	Stanislas
Physiologie, soologie et parasitologie pharmaceutique	Roux

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie	M. Couturier
Sciences naturelles	Mme Caujolle
Toxicologie	M. Broussy G.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Chimie organique	MM. Bertrand
Zoologie	Gayrel

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Botanique	Mme Lascombes
Microbiologie	MM. Michel G.
Pharmacodynamie	Cros Jean
Physiologie	Dumas J.-C.
Pharmacie galénique	Rouffiac R.
Chimie biologique	Soula G.
Toxicologie	Malbosc R.

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal : **M. J. Roche**

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(délibération en date du 12 mai 1891)

A MES PARENTS

A JACQUES et NATHALIE

A MES SŒURS et BEAUX-FRÈRES

A Madame P. GÉRARD

A Monsieur le Professeur Jean DUCOS

Professeur d'Immunologie à la Faculté de Médecine de Toulouse
Biologiste des Hôpitaux, chef de service
Chevalier de l'Ordre National du Mérite

Il nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Nous sommes heureux de le remercier ici de la bienveillance qu'il nous a montrée et des conseils très pertinents et très fructueux qu'il nous a donnés dans l'élaboration de ce travail.

Nous voulons aussi lui dire notre gratitude pour l'excellent enseignement qu'il nous a prodigué.

A Messieurs les Membres du Jury

Monsieur R. BIERMÉ

Maître de Conférences Agrégé.
Chef de Service au Centre de Transfusion Sanguine d'Hématologie et de Génétique Humaine.

Monsieur G. LARROUY

Maître de Conférences Agrégé.
Biologiste des Hôpitaux.

Monsieur J.-P. SOLEIHAVOUP

Maître de Conférences Agrégé.
Biologiste des Hôpitaux.

Suppléant :

Monsieur P. COLOMBIES

Chef de Travaux.
Chef de Service au Centre de Transfusion Sanguine d'Hématologie et de Génétique Humaine.

Ils nous ont fait l'honneur de bien vouloir constituer notre Jury.

A Monsieur le Professeur agrégé

Pierre LORTHOLARY

Biologiste des Hôpitaux.

Il nous a fait aimer la cytologie et nous a guidé tout au long de ce travail.

En témoignage de notre gratitude et de notre profonde admiration pour sa compétence et son enthousiasme.

A Monsieur le Professeur Marcel BESSIS

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris
Directeur de l'Institut Pathologie Cellulaire

Il a bien voulu nous accueillir dans son équipe, nous sommes très heureux de le remercier et de lui faire hommage de ce travail.

A notre Maître Monsieur le Professeur

Jacques RUFFIÉ

Professeur d'Hématologie à la Faculté de Médecine de Toulouse
Directeur du centre régional de Transfusion Sanguine
Directeur d'Hémotypologie du C.N.R.S.

En hommage très respectueux.

A Madame le Docteur Françoise LEJEUNE

dont l'amitié m'est si précieuse. Elle m'a offert son aide efficace et son expérience solide avec une constante bonne humeur.

Au Docteur Jean-Pierre ALLAIN

et au Docteur François TURPIN

Ils m'ont si gentiment accueillie dans leur groupe de travail.

Aux Docteurs G. FLANDRIN, M.-Th. DANIEL

En remerciement de leur aide efficace et amicale.

Aux Surveillantes des laboratoires d'Hématologie
de l'Hôpital de Bicêtre
et de l'Hôpital de Saint-Louis

qui malgré leur travail m'ont offert leurs services dévoués.

A Madame DELPECH

et Mademoiselle FERDINAND-DREYFUS

qui ont si aimablement mis à ma disposition les documents nécessaires à la réalisation de ce travail.

A tous mes amis

et plus particulièrement à René et Andrée SARROTTE

qui m'ont donné si gracieusement leur temps
et leurs efforts pour imprimer cette thèse.

ABRÉVIATIONS

M.G.G.	**May-Grunwald-Giemsa**
L.M.C.	**Leucémie Myeloïde Chronique**
L.L.C.	**Leucémie Lymphoïde Chronique**
L.A.	**Leucémie Aiguë**
S.M.	**Splenomegalie Myeloïde**
P.A.S.	**Periodic-Acid-Schiff**
V.S.	**Vitesse de Sédimentation**
G.R.	**Globules Rouges**
G.B.	**Globules Blancs**
Ly	**Lymphocyte**
PN	**Polynucléaire**
Hb	**Hemoglobine**
Ht	**Hematocrite**
♀	**Femme**
♂	**Homme**
M	**Million**
/mm³	**par millimètre cube**
g/l	**gramme par litre**
mn	**minutes**
M.P.O.	**Myeloperoxydases**
L.D.H.	**Lactico-Deshydrogenases**
S.D.H.	**Succino-Deshydrogenases**
N.B.T.	**Nitro-Blue Tetrazolium**
G 6 P.D.	**Glucose-6-Phosphate Deshydrogenase**
D.P.N.	**Di-Phospho-Nucleotide**
P.H.A.	**Phytohemagglutinine**

INTRODUCTION

Les réactions cytochimiques pouvant être pratiquées sur les cellules du sang sont très nombreuses et d'intérêt inégal. Elles permettent d'identifier certains constituants nucléaires ou cytoplasmiques, reflets du métabolisme cellulaire. Comme les différentes lignées ont chacune leur propre métabolisme il s'ensuit que les réactions cytochimiques fournissent des résultats différents d'une lignée à l'autre. La pratique de ces réactions permet donc en fait :

a) D'explorer en partie l'activité métabolique des cellules, ce qui peut être utile pour l'étude :
— des cellules de la lignée malade dans les hémopathies;
— des cellules n'appartenant pas à la lignée malade dans les hémopathies pour juger d'un éventuel retentissement du processus pathologique sur elles;
— des cellules sanguines chez des sujets non atteints d'hémopathies malignes au cours de différents états physiologiques ou pathologiques (aberrations chromosomiques uniques en particulier), ainsi que chez leurs parents (ce qui n'est pas sans intérêt).

b) De reconnaître, en mettant en évidence certains produits de leur métabolisme, les cellules appartenant à divers stades de maturation dans les différentes lignées. Dans la mesure où ce métabolisme n'est pas trop perturbé par les processus malins, ces réactions permettent d'identifier les cellules leucémiques dont la morphologie est atypique et dont le diagnostic est rendu ainsi difficile. C'est ce deuxième aspect des résultats cytochimiques qui est en général le plus utilisé en pratique courante.

Les réactions cytochimiques les plus anciennes, que nous utilisons actuellement en pratique courante hématologique, sont les suivantes :
— colorations de Perls;
— réaction au noir Soudan;
— réaction du P.A.S.;

— mise en évidence des peroxydases;
— recherche des phosphatases alcalines leucocytaires;
— recherche des esterases non spécifiques.

La description de ces réactions fera l'objet de la première partie de ce travail, comportant pour chaque réaction les paragraphes suivants :
— rappel historique;
— signification de la réaction;
— technique choisie;
— résultats observés dans les différentes lignées;
— modifications lors des affections hématologiques.

Une brève conclusion soulignera l'intérêt de chacune de ces réactions dans les différents désordres hématologiques.

Mais si les lignées rouges et granuleuses ont bénéficié très tôt et exclusivement de ces techniques, il n'en est pas de même de la lignée lymphoïde qui resta longtemps le parent pauvre.

Des réactions plus récentes mais plus complexes et d'interprétation plus délicate font l'objet d'une expérimentation particulière sur cette lignée lymphoïde qui constituera la deuxième partie de ce travail.

Nous avons pratiqué sur les leucémies lymphocytaires chroniques, les Myelomes, les plasmocytoses réactionnelles et quelques affections diverses, les réactions suivantes :
— outre le P.A.S. et les esterases non spécifiques déjà mentionnées;
— la coloration nucléolaire par la méthode de Smetana;
— la mise en évidence :
des hydrogenases;
des phosphatases acides;
de l'adenosine triphosphatase.

Nous présenterons ainsi les résultats préliminaires de l'étude cytochimique qui a été réalisée sur les cellules sanguines de sujets atteints de diverses hémopathies malignes de la lignée lymphoïde.

Faisant suite à cette deuxième partie, un chapitre général de discussion soulignera l'intérêt des réactions cytochimiques en pratique courante, tant par l'aide qu'elles apportent au diagnostic cytologique qu'à l'exploration des perturbations métaboliques cellulaires.

Il tentera ainsi de préciser l'apport des techniques nouvelles de cyto-histochimie dans le diagnostic et le pronostic des hémopathies lymphoïdes.

CHAPITRE I

LES RÉACTIONS CYTOCHIMIQUES COURANTES

1. GÉNÉRALITÉS

Une réaction cytochimique doit posséder trois qualités essentielles : sûreté, sensibilité, spécificité.

La sûreté de la réaction

La réaction utilisée doit réussir dans des conditions dont la précision est possible à réaliser :

— conditions extérieures de température, de pression, de degré hygrométrique;
— conditions de manipulations techniques telles que cette réaction soit reproductible.

Il nous paraît nécessaire d'insister sur l'importance de l'étalement bien fait, des lames propres et parfaitement dégraissées, de façon à obtenir des frottis minces, homogènes et bien séchés.

Elle ne devra pas dépendre de façon absolue de tous ces facteurs afin que l'on puisse comparer des réactions d'un jour à l'autre et d'un sujet à l'autre, et conclure de façon aussi ferme que possible lorsque ces réactions sont négatives.

La sensibilité de la réaction

On a généralement affaire à de très faibles quantités de corps à déceler à l'intérieur de chaque cellule : quantités totales de l'ordre de 10^{-7} ou 10^{-10} γ.

La sensibilité de la réaction dépendra donc moins de la quantité globale de produit recherché que de sa concentration dans tel ou tel endroit du cytoplasme ou du noyau de la cellule.

Cette sensibilité sera limitée par la solubilité des produits recherchés dans les différents réactifs qui peuvent être utilisés soit pour la fixation des frottis, soit pour le rinçage des lames entre deux solutions d'incubation.

La spécificité de la réaction

C'est un point très important à envisager. La réaction doit correspondre à un corps chimique ou à une fonction organique donnés. Or, c'est rarement le cas, et pour remédier au manque de spécificité de la plupart des réactions utilisées, il est bon d'opérer :

— avec un lot de lames témoins ayant subi les mêmes manipulations que les lames à étudier, mais n'ayant pas incubé dans la solution contenant le réactif de base;
— d'avoir à sa disposition une batterie de réactions différentes visant à déterminer le même corps si chacune d'elles prise séparément est peu spécifique;
— d'opérer, en cas de réaction cytoenzymologique, sur un lot de lames témoins ayant subi un traitement inhibiteur de l'enzyme mis en cause.

Il conviendra donc, en définitive, d'interpréter le résultat de ces réactions cytochimiques en connaissant leurs limites, et sans les dépasser.

2. DÉTECTION DES COMPOSÉS DU FER-COLORATION DE PERLS

C'est une réaction cytochimique type qui peut s'écrire sous forme d'une équation chimique.

On utilise classiquement en hématologie la coloration de Perls (63) (71 (66) au bleu de Prusse qui détecte les composés du fer à l'état de sels ferriques.

On se sert d'un complexe où le fer se trouve à l'état masqué : le ferrocyanure de potassium $[(CN)_6Fe^{++}]K_4$. En présence d'un sel ferrique et en milieu acide, le complexe donne le ferrocyanure ferrique ou bleu de Prusse $[(CN)_6Fe^{++}]Fe_4$.

Les sels ferriques apparaissent dans le cytoplasme des cellules sous forme de granules d'un bleu sombre.

Mais en milieu acide le complexe $[(CN)_6Fe^{++}]K_4$ est instable et tend à se décomposer puis à s'oxyder. Il faut donc opérer avec des produits frais et préparer le mélange extemporanément.

C'est une réaction très sensible permettant de détecter de très faibles quantités de fer.

La spécificité en est bonne puisqu'elle correspond à une réaction chimique bien définie.

La *technique* choisie est la suivante :

1) Fixation des frottis pendant 5 minutes dans l'alcool méthylique absolu.

2) Laisser sécher.

3) Préparer extemporanément la solution à 2 % de ferrocyanure de potassium et la solution d'HCl N/10. Mélanger à parties égales.

4) Incuber pendant 5 minutes les lames dans ce mélange.

5) Laver à l'eau distillée.

6) Faire une coloration de fond par l'éosine à 1 % pendant 30 secondes.

7) Rincer à l'eau distillée.

8) Laisser sécher.

Cette réaction peut contribuer à l'étude du métabolisme du fer par la recherche des sidéro-blastes dans la moelle, et des sidérocytes dans le sang.

Les résultats

1) La moelle normale contient 10 à 80 % de sidéroblastes ayant 1 à 5 granules de fer chacun. On ne trouve pas de sidérocytes dans un sang normal (63).

2) Les sidéroblastes sont diminués (21) voire absents dans les anémies hypochromes, hyposidérémiques, tout le fer absorbé par l'erythroblaste a été utilisé pour la synthèse de l'hémoglobine.

3) Ils sont augmentés :

a) Dans tous les cas d'anémie sidéroachrestiques ou anémies dues à un défaut d'utilisation du fer pour la synthèse de l'Hb (44).

L'aspect de la moelle est alors très particulier à la coloration de Perls : très nombreux sidéroblastes (jusqu'à 100 %) avec des grains de fer très nombreux, groupés en couronne périnucléaire (aspect dit de « ring-sidéroblasts »). Ce défaut d'utilisation du fer par l'érythroblaste pour la synthèse de l'hémoglobine peut être dû, soit à l'absence des conditions nécessaires dans le globule rouge à la pénétration du métal dans le noyau porphyrique (anémie saturnine avec blocage partiel de l'héme-synthétase);

— soit à un dérèglement de la synthèse porphyrique localisée dans la chaîne de réactions partant de la glycine et de l'acide succinique pour aboutir à la protoporphyrine III (anémies fluorotoxiques et oxycarboniques, carence en pyridoxine, porphyrie érithropoïetique);

— soit à une altération qualitative ou quantitative des chaînes globiniques (thalassémie).

Enfin il existe des anémies sidéroachrestiques dites primitives

ou idiopathiques dont on ignore totalement les causes qui peuvent être :
— héréditaires et touchant exclusivement le sexe masculin,
— non héréditaires et touchant les deux sexes.

b) Dans l'anémie de Biemer.

c) Dans les hypoplasies médullaires.

3. DÉTECTION DES GRAISSES — NOIR SOUDAN

La méthode la plus couramment utilisée en cytochimie est la coloration par le noir Soudan B.

1) *Le principe* de la méthode est basé sur une propriété fondamentale et qui entre dans la définition des corps gras : leur propriété de solvant vis-à-vis de certains colorants appelés « colorants des graisses ». Ceux-ci comprennent outre le noir Soudan, le rouge Soudan, l'orange Soudan, l'écarlate, le bleu BZL.

Ces colorants se présentent sous forme de poudre, utilisée en solution alcoolisée. Lorsque ce colorant en solution est mis au contact de cellules contenant des graisses, il se déplace du solvant vers les graisses dans lesquelles il est plus soluble. Le coefficient de partage du colorant se fait au profit des graisses cellulaires.

Ce mode de coloration est la seule exception connue à la théorie de Witt admise pour toutes les autres colorations et qui fait intervenir non pas des solubilités différentielles du colorant mais des échanges d'ions entre les groupements tinctophores du colorant et le corps coloré.

2) *La technique* de la réaction est donc simple. De nombreuses méthodes ont été proposées (43) (66) (101). Celle que nous avons adoptée est la suivante (63) :

a) Préparer les solutions :

Solution de noir Soudan B :

Noir Soudan B	0,3 g
Ethanol absolu	100 ml

Solution intermédiaire :

Cristaux de phénol	16 g
Ethanol absolu	30 ml

à ajouter à :

Phosphate disodique	0,3 g
Eau distillée	100 ml

Solution de travail :

Solution de noir Soudan B	60 ml
Solution intermédiaire	40 ml

se conserve plusieurs mois.

b) Fixer par les vapeurs de formol pendant 5 minutes.

c) Laver à l'alcool à 70°.

d) Immerger dans la solution de travail pendant une heure.

e) Laver à l'alcool à 70° pendant 2 à 3 minutes, puis à l'eau pendant 2 minutes.

f) Colorer 20 minutes les noyaux par la solution de Giemsa.

g) Rincer à l'eau distillée tamponnée.

La sûreté de la méthode est bonne. Cette coloration réussit bien lorsque les précautions élémentaires (lames propres et dégraissées, rinçages bien faits) sont respectées.

La sensibilité est également bonne. La répartition des graisses dans le cytoplasme des cellules granuleuses et monocytaires par exemple est différente : gros dépôts groupés dans un même endroit chez les unes, très fins dépôts disséminés dans les autres.

La spécificité de cette réaction est bonne, si l'on se contente de rechercher des lipides en général, mais elle est nulle à l'intérieur du groupe des lipides car elle ne permet pas définir ou de suspecter la nature du corps lipidique en cause : phospholipide, glycolipide, etc.

3) *Résultats* dans les différentes lignées cellulaires normales (5) (12) (43).

La positivité au noir Soudan se traduit par la présence de grains cytoplasmiques d'un noir verdâtre.

Toute la lignée granuleuse est positive avec de gros grains groupés en amas compacts, y compris les éosinophiles.

La série rouge est négative.

La série histiomonocytaire est négative ou positive à grains fins et dipersés.

Les autres lignées sont négatives.

En pathologie, la réaction est surtout utilisée pour identifier les leucémies aiguës myéloblastiques (80) (115).

Comportement cytochimique des différentes lignées cellulaires normales vis-à-vis du noir soudan B	
lignée granuleuse	entièrement positive de l'hémocytoblaste myélogène au polynucléaire
lignée rouge	négative
lignée mégacaryocytaire	négative
lignée lymphoïde	négative
cellules plasmocytaires	négatives
cellules réticulohistiocytaire	cellules réticulaires : négatives (sauf en cas de macrophagie)
	— Histiocytes } négatifs ou positifs à
	— Monocytes } grains fins et dispersés.

4. DÉTECTION DES SUCRES — RÉACTION AU P.A.S.

L'étude cytochimique des polysaccharides a connu un grand essor lorsque la technique de Mac Manus (75) Hotchkiss, dite « Periodic-Acid-Schiff-reaction », est entrée dans la pratique cytohistologique. Il s'agit en fait, d'une réaction de groupe qui vient révéler des substances assez différentes : glycogène, mucopolysaccharides neutres et acides, mucoprotéines, glycoprotéines et lipopolysaccharides (cf. revue de Heckner (47), Graumann (38), Mercker (79).

Le glycogène se reconnaît par sa sensibilité à la digestion salivaire qui le fait disparaître alors que les autres saccharides résistent à cette digestion.

Le principe de cette réaction est simple : après fixation des frottis par une solution alcoolique et formolée, un premier temps d'oxydation par l'acide périodique scinde les chaînes carbonées en tronçons dicarbonés avec libération des groupements aldéhydes. Ces fragments dialdéhydiques sont révélés dans un deuxième temps par le réactif de Schiff (solution sulfureuse incolore de fuschine) qui donne une coloration pourpre intense en présence d'aldéhydes.

On pratique enfin une coloration nucléaire par le vert de méthyle :

— c'est une réaction très sensible, intense, qui permet de colorer 10 γ de substance dans 100 mg de tissu;
— la sûreté est idéale : cette réaction s'accomplit automatiquement;
— la spécificité (86) est très mauvaise.

En effet, tous les mucopolysaccharides neutres sont positifs au P.A.S., fibres de réticuline, certaines membranes cellulaires, certaines sécrétions.

Il existe des moyens de contrôle plus ou moins efficaces qui permettent d'améliorer la sensibilité de la réaction.

a) Blocage par acétylation des coupures en fragments dicarbonés induits par l'oxydation. Des lames acétylées sont traitées parallèlement à des lames non acétylées par l'acide périodique puis par le réactif de Schiff.

— lames acétylées + HIO_4 + Schiff → réaction négative;
— lames normales + HIO_4 + Schiff → P.A.S. +.

Ce blocage est réversible par action de la potasse.

— lames acétylées + potasse + HIO_4 + Schiff → P.A.S. +.

b) Blocage des fonctions dialdéhydiques libérées par des sels d'aniline :

— lames + HIO_4 → aldéhydes + aniline;
→ amines secondaires P.A.S. —

Ces deux premiers types de contrôle permettent de s'assurer que la réaction P.A.S. positive est bien due à la présence de polysaccharides.

A l'intérieur du groupe des polysaccharides, le test de digestion salivaire permet d'affirmer que le sucre en cause est le glycogène. Un frottis témoin est soumis pendant une heure à 37° à la digestion salivaire, puis traité parallèlement au frottis à étudier, par la réaction du P.A.S.

Sur ces frottis témoins, le glycogène digéré par la salive a disparu. La lecture comparative des deux frottis permet d'affirmer si la substance P.A.S. positive est ou non du glycogène.

De nombreuses variantes ont été proposées (42) (43).

Nous avons retenu la méthode suivante :

Technique

— Frottis de sang frais minces et homogènes.
— Sécher rapidement.
— Fixer 10 minutes dans une solution alcool-formol (alcool éthylique 86 ml + formol 14 ml).
— Laver à l'eau distillée, sécher à l'air.
— Bains successifs dans :
  — acide périodique à 0,5 % pendant 10 minutes;
  — solution réductrice 5 minutes;
  — réactif de Schiff 15 minutes;
  — solution réductrice 6 minutes.

La solution réductrice se compose de :

— 20 ml métabisulfite à 10 %,
— 20 ml HCl N,
— 400 ml d'eau dont 200 ml eau distillée,
200 ml eau courante.

— Rincer à l'eau courante pendant 10 minutes.
— Sécher à l'air.
— Contrecolorer avec une solution de vert de méthyle à 0,01 % pendant 30 secondes.

Il faut obtenir une coloration vert pâle des noyaux, ce qui permet un contraste suffisant avec les grains pourpres de glycogène.

— Rincer les lames à l'eau distillée.
— Laisser sécher.

Résultats et interprétation

La positivité du P.A.S. se manifeste par la présence de fines granulations rouge-pourpre, disposées en couronne ou en « col-

lier de perles » dans le cytoplasme. On peut aussi observer de grosses flaques irrégulières intracytoplasmiques ou une coloration diffuse, en grain de poussière.

Dans les différentes lignées cellulaires normales :

a) Dans la série myéloïde :

— Les éléments les plus jeunes de la lignée sont négatifs ou très faiblement positifs.

- La positivité apparaît dans le promyélocyte, elle est plus franche dans le myélocyte et le métamyélocyte.

– · Les polynucléaires neutrophiles sont très positifs : teinte violacée intense, diffuse de tout le cytoplasme.

b) La série rouge est normalement négative, mais à l'état pathologique, un nombre plus ou moins important d'érythoblastes peuvent être positifs.

c) La série mégacaryocytaire est franchement positive à tous les stades de maturation.

d) La série lymphoïde est normalement tout à fait négative.

Mais les lymphoblastes de leucémies aiguës lymphoblastiques sont nettement positifs : plages irrégulières de glycogène réparties dans le cytoplasme, se projetant parfois sur le noyau. Les lymphocytes des leucémies lymphoïdes chroniques (33) sont également positifs, dans une proportion variant de 5 à 90 %.

e) Les cellules réticulaires sont négatives. Les histiocytes et monocytes sont faiblement positifs avec une teinte rosée de leur cytoplasme, ou des granulations dispersées de taille variable.

f) La lignée plasmocytaire est négative.

TABLEAU RÉCAPITULATIF

Comportement cytochimique des différentes lignées cellulaires normales vis-à-vis du P.A.S.

lignée granuleuse	Hémocytablaste Myéloblaste	0
	Promyélocyte Myélocyte Métamyélocyte	± à +
	Polynucléaire	+ +
lignée rouge		0
lignée mégacaryocytaire		+ +
lignée lymphoïde		0
lignée plasmocytaire		0
lignée réticulo histio monocytaire		0 ± à +

5. RECHERCHE DES PÉROXYDASES LEUCOCYTAIRES

La mise en évidence des péroxydases est une réaction très ancienne dont il existe de nombreuses variantes (17) (43) (51) (57) (66) (117).

Le principe en est le suivant

Ce sont des enzymes de transport dont le coenzyme est une ferroporphyrine et qui n'agissent pas directement sur l'oxygène de l'air mais sur des péroxydes

$$\underset{\text{péroxyde}}{H_2O_2} + \underset{\text{substrat oxydable}}{H_2R} \longrightarrow 2H_2O + \underset{\text{substrat oxydé}}{R}$$

On proposera donc aux cellules supposées contenir une péroxydase :

— un péroxyde : l'eau oxygénée,
— un substrat oxydable : la benzidine donnant par oxydation un produit coloré; et on fera une coloration de fond par le Giemsa à 7 %.

Discussion

Sûreté : la réaction est très simple à réaliser à condition de respecter les précautions requises pour éviter l'autooxydation de la solution de benzidine à l'air.

La valeur spécifique de la réaction n'est pas idéale puisque, dans certaines conditions de concentration en eau oxygénée, peut apparaître l'activité dite pseudo-péroxydasique de l'hémoglobine qui donne aux hématies une fausse positivité.

Cette propriété est d'ailleurs utilisée en neuro-histologie pour suivre le trajet des très fines ramifications des vaisseaux sanguins dans les centres nerveux.

Nous avons adopté pour technique une modification de celle de Kaplow (57).

Technique

a) Solutions à préparer :

— sol. A : Benzidine : 0,25 g
Ethanol à 95° : 100 cc

— sol. B : Nitroprussiate de Na : 25 g
Eau distillée : 100 g

— sol. C : 100 cc sol. A + 2 cc sol. B

b) Technique :

1. Recouvrir les lames de solution C en filtrant directement sur les lames (fixation) : 3 minutes.
2. Décanter et recouvrir pendant 5 minutes de mélange à parties égales, préparé extemporairement avec :
   — sol. C,
   — H_2O_2 à 3 % diluée au 1/50e.
3. Décanter, laver à l'eau distillée tamponnée.
4. Colorer 20 minutes par le Giemsa à 7 %.

Résultats

L'activité péroxydastique se révèle par la présence de grains bleu-verts dans le cytoplasme.

a) La série myéloïde est entièrement positive depuis l'hémocytoblaste myélogène (qui au May Grünwald Giemsa n'a pas de grains cytoplasmiques) jusqu'au polynucléaire neutrophile.
Les granulations sont groupées en amas compacts.

b) Les séries rouge et mégacaryocytaire sont négatives.

Tableau récapitulatif

lignée granuleuse	entièrement positive de + à ++
lignée rouge	0
lignée mégacaryocytaire	0
lignée lymphoïde	0
lignée plasmocytaire	0
lignée réticulo histio monocytaire	0 0 0 à +

c) Les monocytes sont parfois négatifs, parfois positifs avec des grains fins et dispersés dans le cytoplasme.

Contrairement aux éléments granuleux, ils perdraient rapidement cette activité péroxydasique. D'après Undritz (117) des frottis conservés six semaines avant la coloration seraient encore positifs aux péroxydases pour la série granuleuse, mais totalement négatifs pour la série monocytaire.

6. RECHERCHE DES PHOSPHATASES ALCALINES LEUCOCYTAIRES

Il ne s'agit plus ici d'une enzyme de transfert mais d'une enzyme de scission appartenant au grand groupe des estérases : les phosphatases alcalines sont des phosphomonoestérases, permettant la scission d'un composé monophosphatasique par estérification en milieu à pH alcalin.

De très nombreuses techniques ont été mises au point (17) (63) (94) (41) (58) (56).

Les techniques les plus employées en pratique courante appartiennent au groupe des réactions de diazocouplages

$$\text{phosphate de naphtol} \xrightarrow{\text{phosphatase alcaline}} \text{libération du naphtol}$$

puis, naphtol + sel de diazonium → composé coloré.

On propose donc à la cellule supposée contenir une phosphatase alcaline :

— un phosphate de naphtol : α naphtylphosphate acide de sodium;

— un sel de diazonium : le fast Blue RR / BB / Fast Garnet GBC } Salt

en solution tamponnée à pH 9,5.

Le précipité coloré, témoignant du diazocouplage, sera trouvé dans le cytoplasme des cellules, contenant la phosphatase alcaline.

Nous utilisons la technique suivante (63) :

Technique

Solution à préparer :

1° Fixateur.

— alcool méthylique absolu.....	90 ml
— formol du commerce.....	10 ml

2° Solution A.

— 2 amino. 2 méthyl 1-3 propanédiol.. 10,5 g
— eau distillée. . . . . 500 ml

3° Solution B, pH 9,5 à conserver au réfrigérateur.

— sol. A. . . . . 25 ml
— HCl N/10. . . . . 5 ml
— eau distillée. . . . . q.s.p. 100 ml

4° Solution vert de méthyle à 3 % dans le tampon pH 9,5.

Procédé

1. Fixation : immerger les lames dans le fixateur pendant 30 secondes à 4 °C.
2. Rincer à l'eau.
3. Faire sécher à l'air.
4. Préparer extemporairement une solution contenant (pour 10 lames) :

— 20 ml de solution B;
— 20 mg de α naphtyl phosphate acide de Na;
— 20 mg de Fast Garnet GBC salt.

Filtrer ce mélange directement sur les lames et laisser 10 minutes.

5. Rincer à l'eau.
6. Colorer les noyaux par le vert de méthyle pendant 5 minutes.
7. Rincer à l'eau.

Discussion

C'est une réaction sûre si les conditions de pH sont respectées et si la préparation du mélange est instantanée (car risque de décomposition spontanée des sels de diazonium).

La spécificité est très bonne, mais il faut éviter les erreurs d'interprétation par diffusion de l'enzyme au cours de l'incubation.

Résultats

L'activité phosphatasique apparaît sous forme d'un précipité brun dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles du sang. Les autres cellules sanguines et médullaires (sauf les érythroblastes) sont négatives.

On exprime généralement l'activité phosphatasique (56) (85) (63) des polynucléaires du sang sous forme semi-quantitative :

On compte à l'immersion 100 polynucléaires.

On attribue à chacun d'eux une cote qui varie de 0 à 4 selon l'intensité de la positivité :

0 aucune coloration;
1 cytoplasme à peine beige-brun. *Pas de grains.*
2 cytoplasme brun. *Quelques granulations.*
3 cytoplasme brun foncé. *Granulations nombreuses de répartition irrégulière.*
4 granulations si nombreuses que le cytoplasme apparaît brun noir.

On additionne les cotes attribuées. Le score total chez un individu normal varie de 20 à 80.

7. MISE EN ÉVIDENCE DES ESTÉRASES NON SPÉCIFIQUES

Ce ne sont plus des estérases hydrolysant les sels d'acide phosphorique mais des sels d'acide gras. Ce sont des estérases carboxyliques, ou aliestérases.

Le principe est exactement le même que celui de la réaction des phosphatases alcalines :

— libération par estérification de l'acide gras d'un radical alcoolique : α naphtyl acétate → α naphtol libéré;
— puis couplage avec un sel de diazonium :
α naphtyl + fast blue BB → précipité brun à pH 6,9;
— coloration des noyaux par l'hémalun.

Ces estérases sont mises en évidence à l'aide de divers substrats (α naphtyl acétate, naphtol AS acétate, naphtol A.S.D. chloroacétate et réaction de couplage avec divers colorants azoïques (Fast blue BB salt, Fast Red violet LB salt). Ces estérases ont fait l'objet de nombreux travaux :

Hayhoe dans les leucoses aiguës (43), Löffler (69), Braunsteiner (16), Leder (62) qui ont surtout fait porter leurs efforts sur l'étude des éléments de la série monocytaire.

Cependant ces mêmes auteurs ainsi que Szmigielski (144) ont également étudié ces enzymes dans les plasmocytes des myélomes.

Techniques

Parmi les nombreuses techniques proposées par la littérature, nous avons retenu celles de Loeffler reprises par Braunsteiner auxquelles nous avons apporté quelques modifications de détail.

1) *Estérases α naphtyl.* Fixation des frottis de sang, moelle ou ganglion séchés à l'air par les vapeurs de formol pendant 5 mi-

nules à température ambiante. Cette fixation doit être effectuée le plus rapidement possible après le prélèvement. Elle ne devra pas en tout cas attendre plus de 48 heures.

Rincer à l'eau courante.

Incubation de 20 minutes à température ambiante dans un milieu préparé extemporanément et filtré, comprenant :

20 ml de tampon phosphate Sorensen pH 7,2;
20 mg de α naphtyl acétate de Na dissous dans 1 ml d'acétone pur;
20 mg de Fast blue BB Salt.

Rincer à l'eau courante.

Contrecolorer 5 minutes par le rouge neutre à 1 % ou l'hématun de Meyer.

Rincer à l'eau courante.

Laisser sécher.

La positivité se manifeste sous forme d'un dépôt brun noir de granulations dans le cytoplasme des cellules dont le noyau est coloré en rouge ou en violet selon la contrecoloration choisie.

2) *Estérases naphtol AS acétate.* Même technique de fixation : Remplacer dans le milieu d'incubation l'α naphtyl acétate par le naphtol AS acétate, à la même concentration dans l'acétone.

Contrecolorer par le rouge neutre à 1 % pendant 5 minutes.

Ici, l'activité enzymatique s'extériorise par un précipité sous forme de grains bleu vif dans le cytoplasme des cellules dont le noyau est rouge.

3) *L'inhibition* de cette dernière réaction s'obtient en ajoutant au milieu d'incubation du fluorure de sodium à la concentration de 1,5 mg/ml de tampon.

Pour ces deux réactions décrites, nous avons réparti les éléments positifs en trois catégories, afin d'évaluer grossièrement l'intensité de l'activité enzymatique.

\+ positivité faible, diffuse, faite de grains très fins;
\+\+ positivité plus forte, à grains plus gros;
\+\+\+ forte positivité avec de nombreux gros grains.

En ce qui concerne la sûreté et la spécificité de la réaction, nous pouvons faire les mêmes remarques que pour les phosphatases alcalines leucocytaires (14) (16) (66) (121) (43).

Les résultats

Les cellules contenant l'enzyme ont dans leur cytoplasme des granulations noirâtres ou bleu vif selon le substrat choisi.

Les noyaux sont colorés en bleu ou rouge.

1. Dans la série granuleuse : tous les éléments peuvent contenir quelques granulations cytoplasmiques fines et peu nom-

breuses. Le promyélocyte serait l'élément le plus riche en activité estérasique.

2. Dans la série rouge : présence de l'enzyme avec positivité plus forte dans les premiers stades de maturation.
— La série mégacaryocytaire : nettement positive.
— Série lymphoïde : pratiquement négative.
— Série réticulo-histio-monocytaire : c'est la lignée qui présente la plus forte et la plus nette positivité.
— Les cellules réticulaires, les histiocytes et surtout les monocytes sont très positifs : leur cytoplasme apparaît souvent noirâtre avec des dépôts de grains très compacts.
— Les plasmocytes sont négatifs à l'état normal.

Tableau récapitulatif

lignée granuleuse	± à + (promyélocyte)
lignée rouge	± à +
lignée mégacaryocytaire	++
lignée lymphoïde	0 à ±
plasmocytes	0
cellule réticulohistiocytaire cellule monocytaire	+++

	NOIR SOUDAN	P.A.S.	PEROXY-DASES	PH ALCALINES	ESTE-RASES NON SPECIFI.
HB lignée granuleuse. . . . . . Poly	++	0 à ++	++	0 à + Polyneutro du sang +	±
lignée rouge. . . .	0	0	0	+	+
lignée mégacaryocytaire. . .	0	++	0	0	++
lignée lymphoïde.	0	0	0	0	0 à ±
plasmocytaire . .	0	0	0	0	0
cell. réticulaires.	0	0			
histiocytes.	+ —	+ — à	0	0	++ à
monocytes.	+ —	++			+++

8. QUELQUES APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES DE CES MÉTHODES EN HÉMATOLOGIE

Nous avons surtout envisagé les résultats sous l'angle qualitatif et l'on peut bien souvent s'en contenter. Il est toutefois possible aussi de les exprimer de façon semi-quantitative par des scores, signalés pour les phosphatases, mais utilisables aussi pour les autres réactions : P.A.S. et péroxydases en particulier.

Certains auteurs ont même proposé, pour plus de précision, de représenter les résultats sous forme d'histogrammes dont l'aspect permet d'accentuer les différences entre certains groupes de sujets sains ou malades (Grozdea) (36).

En effet, la cytochimie permet d'explorer dans une certaine mesure le métabolisme cellulaire. Comme celui-ci est différent d'une cellule à l'autre et d'une lignée à l'autre les images obtenues sont souvent assez caractéristiques et permettent d'identifier comme nous l'avons vu beaucoup de cellules normales.

Dans les cas pathologiques, ce métabolisme est plus ou moins perturbé.

Dans certains cas pas assez pour modifier profondément l'aspect cytochimique des cellules alors que leur aspect en coloration panoptique peut être très altéré : les réactions cytochimiques peuvent donc aider à les identifier (ex. : les péroxydases des myéloblastes).

Dans d'autres cas les modifications pathologiques sont au contraire caractéristiques d'un processus particulier qu'elles signent en quelque sorte (ex. : P.A.S. des lymphoblastes).

Parfois enfin les modifications sont telles que les images obtenues sont très différentes de celles trouvées dans les cellules normales.

Lorsque les cellules ne sont pas identifiables par leur morphologie, les réactions cytochimiques ne peuvent servir au diagnostic, par contre lorsque les cellules sont identifiables par la morphologie, les réactions cytochimiques sont alors d'un très grand intérêt.

Diagnostic des L.A. (115) (43) (80).

Le diagnostic des L.A. est posé au MGG.

— mais le cytologiste est parfois gêné pour classer dans l'une ou l'autre catégorie les blastes qu'il examine.

Les quelques réactions cytochimiques que nous avons citées pourront alors lui être utiles : les blastes sont généralement

positifs à une réaction seulement de façon partielle. Le pourcentage des blastes positifs peut varier de 10 à 100 %.

Le problème de classification se pose aussi lors d'une L.A. myéloblastique avec éléments « monocytoïdes ».

Cytochimie des blastes des l. a.

TYPE de la L.A.	P.A.S.	PEROXYDASES	NOIR SOUDAN	ESTÉRASES	PHOSP. ALCALINES
myéloblastique	—	+	+	—	score < 40
lymphoblastique	+	—	–	- -	score > 40
monoblastique	±	—	—	+	score élevé > 80

Les éléments du sang circulant sont difficiles à classer au MGG entre monocytes véritables ou blastes « monocytoïdes ».

On fera sur ces frottis : péroxydases (coloration immédiate et retardée : technique de Undritz) et estérases.

S'il s'agit de monocytes : les péroxydases immédiates seront peut-être positives mais disparaîtront en six semaines.

Les estérases seront positives à l'α naphtol et complètement inhibées par le fluorure de sodium. S'il s'agit de myéloblastes, les péroxydases seront positives encore après six semaines et les estérases positives à l'α naphtol ne seront pas influencées par le fluorure de sodium.

Diagnostic des leucémies chroniques

a) Cas d'une L.L.C.

Le diagnostic est souvent posé sur le simple aspect au MGG. Mais il est des formes où la lymphocytose est modérée, où la moelle est peu envahie. L'argument du P.A.S., bien que faible, est cependant appréciable puisqu'il est positif sous forme de grains fins, entourant le noyau en une couronne régulière dans 5 à 90 % des lymphocytes du sang, de la moelle, et même du ganglion des L.L.C.

b) Dans le diagnostic différentiel souvent difficile entre L.M.C. et S.M., les phosphatases alcalines leucocytaires sont intéressantes (41) (43) (58) (80) (71).

Elles sont en effet effondrées (< 10) dans les L.M.C. en phase chronique et très souvent augmentées dans les splénomégalies myéloïdes.

Par contre, l'élévation brutale du taux des P.A.L. au cours d'une L.M.C. connue, précède et indique parfois la survenue d'une transformation aiguë de la maladie.

Au cours des Sarcomes ganglionnaires

Les réactions du P.A.S. et des estérases ont apporté quelques résultats intéressants (64).

Les lymphoblastosarcomes sont en effet singularisés des réticulosarcomes par la réaction des estérases (estérases positives seulement dans les sarcomes) et des L.A. lymphoblastiques par la réaction du P.A.S. (P.A.S. positif dans les L.A., habituellement négatif dans les sarcomes).

L'intérêt du P.A.S. dans les L.L.C. sera souligné dans le chapitre suivant, consacré à l'expérimentation particulière sur la lignée lymphoïde.

Diagnostic de quelques cas d'anémies

Le Fer :

Les sidéroblastes sont diminués ou absents dans les anémies hypochromes hyposidérémiques. Ils sont augmentés dans tous les cas d'anémie sidéroachrestique ou anémie due à un défaut d'utilisation du fer pour la synthèse de l'Hb (anémie saturnine, anémies fluorotoxiques et oxycarboniques, carence en pyridoxine, porphyries érythropoïétiques, thalassémie).

Les sidéroblastes sont aussi augmentés dans l'anémie de Biermer et dans des hypoplasies médullaires.

Le P.A.S.

Dans certains cas, les érythroblastes peuvent avoir une réaction positive au P.A.S. : lors des anémies sidéroblastiques, thalassémie, anémies mégaloblastiques, anémies hypochromes et au cours des leucémies.

	P.A.S.	ESTERASES NON SPECIFIQUES
Lymphoblastosarcomes à petites cellules	+ + +	—
Lymphoblastosarcomes à grandes cellules	—	—
Reticulosarcomes	—	+ à + +

Exploration des lignées en apparence saines au cours des hémopathies

Elles révèlent des troubles métaboliques des P.N. ou des G.R. en dehors des atteintes de la lignée granulocytaire sanguine de sujets ayant des anomalies chromosomiques morphologiques ou fonctionnelles à caractère héréditaire.

Une étude portant sur les myélopéroxydases des P.N. du sang d'adultes des deux sexes montre une différence entre l'histogramme des M.P.O. de l'homme et celui de la femme. Dans le syndrome de Turner (44 xo) Grozdea et Coll (36) trouvent des coefficients de M.P.O. inférieurs aux indices moyens rencontrés chez la femme ainsi que chez l'homme témoins.

Dans le cas du syndrome de Klinefelter (44 xxy) ces mêmes auteurs trouvent un taux péroxydasique presque identique à celui d'une femme normale.

Il s'avère donc très intéressant d'associer la cytochimie à la cytogénétique et d'objectiver ainsi des anomalies métaboliques primitives ou secondaires à une aberration chromosomique.

Cependant, comme nous l'avons déjà souligné, l'étude cytochimique n'est qu'un complément des résultats obtenus par l'étude morphologique classique, et en aucun cas on ne devra interpréter des résultats cytochimiques sans avoir examiné les mêmes frottis colorés au MGG.

CHAPITRE II

EXPÉRIMENTATION PARTICULIÈRE

INTRODUCTION

L'étude cytochimique des leucémies aiguës a grandement bénéficié de l'apport de techniques nouvelles de cyto-histochimie qui ont permis de renouveler bien des idées reçues sur différents problèmes; il suffit de citer la question jusqu'alors insoluble de la leucémie à monocytes qui n'avait pas avancé d'un pouce depuis la querelle entre Otto Nœgeli et V. Schilling et qui récemment, grâce aux travaux de l'Ecole allemande (Löffler (69), Leder (62)) semble avoir trouvé une solution satisfaisante.

Les hémopathies lymphoïdes ne semblent pas avoir fait l'objet d'études aussi fructueuses. Mis à part l'intérêt depuis longtemps reconnu à la réaction du P.A.S. dans les lymphocytes des leucémies lymphocytaires, seules quelques publications isolées font état d'études cytochimiques menées sur des lymphocytes ou des plasmocytes. Cependant leurs résultats, bien que partiels, ont attiré notre attention et nous ont incité à reprendre l'étude de ces problèmes.

Le travail que nous présentons ici est encore fragmentaire. Les réactions que nous avons pratiquées ne sont pas très nombreuses, s'adressant à un nombre de cas insuffisant et surtout n'ont pu être systématiquement répétées au cours de l'évolution de l'affection chez les différents patients.

Cependant les premiers résultats que nous avons obtenus ont vérifié pour nous le bien-fondé des conclusions de certains travaux antérieurs et vont nous conduire à l'élaboration de protocoles plus précis, d'études régulièrement répétées au cours de l'évolution de certaines hémopathies lymphoïdes, dont nous espérons qu'elles apporteront quelques clartés sur différents problèmes de diagnostic et de pronostic de ces maladies.

Ces premiers résultats seront présentés selon le plan suivant : après la présentation du matériel d'étude utilisé (témoins puis

malades), chaque réaction étudiée constituera un chapitre comprenant :

— l'historique,
— la technique retenue,
— le mode d'expression des résultats,
— enfin, les résultats obtenus;

les réactions que nous avons pratiquées sont :

— la réaction du P.A.S.,
  la coloration nucléolaire par la méthode de SMETANA,
— la recherche
  — des déshydrogénases lactiques et succiniques,
  — des estérases non spécifiques,
  — des phosphatases acides,
  — de l'adénosine triphosphatase.

Un chapitre général de discussion viendra alors regrouper ces résultats et tenter de préciser l'apport de ces études cytologiques dans le diagnostic et le pronostic des hémopathies lymphoïdes.

EXPÉRIMENTATION PROPREMENT DITE

1. MATÉRIEL D'ÉTUDE

Les témoins normaux

Nous avons effectué ces réactions sur une série de quinze témoins choisis parmi des adultes jeunes des deux sexes et des enfants ne présentant aucune anomalie clinique ni biologique - ils sont numérotés T 1, T 2, etc. —; les adultes sont numérotés de T 1 à T 13, et les enfants portent les numéros T 14 et T 15 (le n° T 14 étant âgé de deux mois et demi, et le n° T 15 de six mois).

Ces témoins ont servi aux trois réactions suivantes : P.A.S., coloration nucléolaire et déshydrogénases.

Les L.L.C.

Notre étude porte sur 18 cas de L.L.C., numérotés de 1 à 18, sur lesquels nous avons fait :

— la réaction du P.A.S.,
— la coloration nucléolaire,
— la mise en évidence des déshydrogénases lactiques et succiniques.

Nous présentons chacun de ces malades par les données biologiques et cliniques qui nous paraissent intéressantes. Nous mentionnons seulement :

— l'âge, le sexe, le début apparent de la maladie, la présence ou non d'un traitement lors de notre prélèvement;
— l'hémogramme ne comportant que : taux d'Hb, Ht, chiffre de GR, GB, lymphocytose absolue;
— le myélogramme : avec la richesse du frottis et le chiffre de lymphocytose absolue.

Nous signalons les adénopathies lorsqu'elles sont présentes.

Malade n° 1

♀ de 68 ans. — Début en décembre 1969.
Traitée depuis janvier 1969 avec 2 g chloraminophène/j.

hémogramme du 16-3-1970 : GR 3,5 M Hb 11,25 g Ht 36 % GB 2 800 lymphocytose 1 036/mm³

myélogramme du 17-3-1970 : richesse normale 68 % de lymphocytes

Malade n° 2

♂ de 72 ans. — Début maladie en janvier 1970, pas de traitement.

hémogramme du 17-4-1970 : GR 5,9 M Hb 16,2 g Ht 51 % GB 9 400 lymphocytose 4 418/mm³

myélogramme du 17-4-1970 : moelle riche avec 98 % de lymphocytes polyadénopathies

Malade n° 3

♂ de 70 ans. — Début en décembre 1969, non traité.

hémogramme du 1-5-1970 : GR 3,3 M Hb 11,3 g Ht 37 % GB 8 600 lymphocytose 5 848/mm³

myélogramme du 1-5-1970 : moelle de richesse normale avec 75 % de lymphocytes

Adénopathies cervicales droite et axillaire D et G.

Malade n° 4

♀ de 63 ans. — Début en novembre 1969, non traitée.

hémogramme du 10-3-1970 : GR 4,9 M Hb 15,7 g Ht 46 % GB 23 000 avec 9 890 lymphocytes/mm³

myélogramme du 10-3-1970 : richesse moyenne 41 % de lymphocytes

Malade n° 5

♂ de 66 ans. — Début en janvier 1969, pas de traitement.

hémogramme du 22-1-1970 : GR 3,6 M GB 15 000 avec lymphocytose 12 300/mm³

myélogramme du 22-1-1970 : richesse normale avec 53 % de lymphocytes quelques adénopathies inguinales, légère hépatomégalie.

Malade n° 6

♀ de 47 ans. — Début en janvier 1970, non traitée.

hémogramme du 29-4-1970 : GR 3,8 M Hb 12,5 g Ht 38 % GB 19 200 avec 14 400 lymphocytes/mm³

myélogramme du 30-4-1970 : richesse normale 75 % de lymphocytes.

Malade n° 7

♀ de 70 ans. — Début en janvier 1970, traitée depuis février 1970 par deux comprimés de chloraminophène/j.

hémogramme du 31-3-1970 : GR 4 M Hb 10 g Ht 35 % GB 18 200 lymphocytes 14 560/mm³

myélogramme du 31-3-1970 : moelle très riche avec 64 % de lymphocytes

Polyadénopathies et splénomégalie.

Malade n° 8

♀ de 93 ans. — Début en février 1970, non traitée.

hémogramme du 27-4-1970 : GR 3,6 M GB 24 000 lymphocytose 15 600/mm³

myélogramme du 30-4-1970 : moelle riche avec 80 % de lymphocytes

Malade n° 9

♂ de 55 ans. — Début en mars 1970, non traité.

hémogramme du 16-3-1970 : GR 4,8 M Hb 14,5 g Ht 44 % GB 32 000 lymphocytose 18 560/mm³

myélogramme du 16-3-1970 : moelle riche avec 76 % de lymphocytes

Polyadénopathies.

Malade n° 10

♂ de 58 ans. — Début en janvier 1970, non traité.

hémogramme du 6-5-1970 : GR 4,6 M Hb 13,5 g Ht 41 % GB 23 200 avec 18 792 lymphocytes/mm³

myélogramme du 6-5-1970 : moelle moyennement riche 45 % de lymphocytes

Malade n° 11

♂ de 66 ans. — Début en février 1970, non traité.

hémogramme du 8-4-1970 : GR 3,2 M Hb 10 g Ht 33 % GB 24 800 avec 22 816 lymphocytes/mm³

myélogramme du 8-4-1970 : moelle riche avec 95 % de lymphocytes

Polyadénopathies.

Malade n° 12

♂ de 57 ans. — Début en mars 1970, non traité.

hémogramme du 17-3-1970 GR 4,4 M GB 40 800 lymphocytose 37 864/mm³

myélogramme du 17-3-1970 moelle riche avec 93 % de lymphocytes

Adénopathies cervicales droites et inguinale D et G.

Malade n° 13

♂ de 78 ans. — Début en novembre 1969, traité depuis le 9 janvier 1970 par deux comprimés de chloraminophène/j.

hémogramme du 18-3-1970 GR 3,6 M Ht 33 % GB 40 000 dont 39 200/mm³

myélogramme du 18-3-1970 moelle riche avec 91 % de lymphocytes

Polyadénopathies avec splénomégalie.

Malade n° 14

♂ de 82 ans. — Début maladie en janvier 1963, refus de traitement.

hémogramme du 22-4-1970 GR 3,3 M Ht 33 % GB 65 000 avec 56 550 lymphocytes/mm³

myélogramme du 22-4-1970 les lymphocytes ont des inclusions cristalloïdes intracytoplasmiques de nature macroglobulinémiques

Polyadénopathies.

Malade n° 15

♂ de 76 ans. — Début en mars 1970, pas de traitement.

hémogramme du 17-3-1970 GR 4,9 M Ht 46 % GB 86 000 dont 78 260 lymphocytes/mm³

myélogramme du 18-3-1970 moelle riche avec 73 % de lymphocytes

Splénomégalie.

Malade n° 16

♀ de 65 ans. — Début en janvier 1970, non traitée.

hémogramme du 29-4-1970 GR 3,1 M Hb 9,25 g Ht 33 % GB 128 000 avec 125 440 lymphocytes/mm³

myélogramme du 30-4-1970 moelle riche avec 86 % de lymphocytes

Polyadénopathies, hépatomégalie, splénomégalie.

Malade n° 17

♀ de 74 ans. — Début en janvier 1960, traitée par deux comprimés de chloraminophène/j pendant dix ans.

hémogramme du 27-2-1970 — GR 3 M Ht 29 % GB 284 600 dont 275 862 lymphocytes/mm³

myélogramme du 27-2-1970 — moelle très riche avec 99 % de lymphocytes

Polyadénopathies.

Malade n° 18

♂ de 63 ans. — Début en mars 1970, non traité.

hémogramme du 7-4-1970 — GR 4 M GB 307 200 avec 297 984 lymphocytes/mm³

myélogramme du 7-4-1970 — moelle riche avec 83 % de lymphocytes

Polyadénopathies axillaires D et G. Cervicales D et G. Inguinales D et G.

Les Myélomes

Nous avons étudié quelques réactions sur 10 cas de myélomes numérotés de 19 à 27 auxquels il faut rajouter le n° 34.

Nous les présentons ici en indiquant pour chaque malade : l'âge, le sexe, le début apparent de la maladie, la présence ou non de traitement au moment de notre prélèvement, l'hémogramme et le myélogramme du jour, la vitesse de sédimentation, le taux de protides, la globuline sécrétée et les lésions osseuses.

Malade n° 19

♂ de 42 ans. — Début en janvier 1968, traité depuis octobre 1968.

hémogramme du 9-4-1970 — GR 3,2 M Hb 11,65 g Ht 33 % GB 5 400 Plaquettes 70 000/³

myélogramme du 10-4-1970 — 46 % granuleux
26 % cell. lignée rouge
16 % lymphocytes
12 % plasmocytes
Mégacaryocytes présents

V. S. : 55/105.

Protides totaux : 84 g/l pic de γ globulines.

Pas de lacunes osseuses.

Malade n° 20

♀ de 66 ans. — Début en janvier 1962, traitée depuis 18 mois par Alkeran 4 comprimés/j (8 mg).

hémogramme du 5-5-1970 : GR 3,4 M Hb 11,5 g Ht 36 % GB 8 400 avec 75 % PN

myélogramme du 6-5-1970 : 43 % cell. lignée granuleuse
27 % lignée rouge
14 % lymphocytes
16 % plasmocytes

V. S. : 84/115.

Protides totaux 79 g/l pic d'Ig A monoclonale.

Lacunes dans la voûte cranienne.

Malade n° 21

♂ de 80 ans. — Début en février 1970, non traité.

hémogramme du 23-4-1970 : GR 2,8 M Hb 8,20 Ht 25 % GB 6 900 avec 80 % de PN
Plaquettes 100 000/mm³

myélogramme du 23-4-1970 : 46 % cell. lignée granuleuse
18 % lignée rouge
12 % lymphocytes
24 % plasmocytes
Mégacaryocytes présents

V. S. : 150/150.

Protides totaux 108 g/l pic des Ig A.

Malade n° 22

♂ de 70 ans. — Début en mai 1970, non traité.

hémogramme du 25-5-1970 : GR 2,2 M Ht 22 % GB 2 800 PN 55 %
Plaquettes 250 000/mm³

myélogramme : 43 % lignée granuleuse
20 % lignée rouge
6 % lymphocytes
31 % plasmocytes

V. S. : 125/143.

Protides 106 g/l pic des γ à 48 g/l.

Signes osseux : géodes du bassin, ostéoporose diffuse.

Malade n° 23

♂ de 72 ans. — Début en février 1966, pas de traitement.

hémogramme du 14-5-1970 : GR 4,3 M Ht 41 % Hb 14,4 g GB 6 900 avec 59 % PN

myélogramme du 14-5-1970 :
33 % lignée granuleuse
19 % lignée rouge
6 % lymphocytes
42 % plasmocytes

V. S. : 87/120.

Protides totaux 84 g/l pic des γ globulines à 37 g/l.

Signes osseux : lacunes dans le maxill. inf. D, atteintes vertébrales.

Malade n° 24

♀ de 70 ans. — Début en janvier 1970, pas de traitement.

hémogramme du 9-5-1970 : GR 3,2 M Hb 11,6 g GB 5 500 avec 80 % PN
Plaquettes 70 000/mm³

myélogramme du 9-5-1970 :
32 % lignée granuleuse
13,5 % série rouge
8 % lymphocytes
0,5 % monocytes
46 % plasmocytes

V. S. : 55/105.

Protides totaux 84 g/l pic des γ globulines à 49 g/l.

Signes osseux : ostéoporose diffuse, tassement de D4.

Malade n° 25

♀ de 73 ans. — Début en juin 1968, traitée par Melphalan, 1/2 comprimé/j.

hémogramme du 19-3-1970 : GR 2,6 M GB 10 900 dont 60 % PN
Plaquettes 120 000/mm³

myélogramme du 19-3-1970 : 46 % de plasmocytes

V. S. : 95/137.

Protides totaux 69 g/l avec pic des γ globulines à 27 g/l.

Pas de lésion osseuse.

Malade n° 26

♀ de 78 ans. — Début en juin 1970, non traitée.

hémogramme du 12-6-1970 : GR 3,5 M Hb 12,7 g Ht 39 % GB 3 800 PN 78 % Plaquettes 100 000/mm³

myélogramme du 12-6-1970 : 23 % lignée granuleuse, 9 % lignée rouge, 10 % lymphocytes, 58 % plasmocytes

V. S. : 54/91.

Protides totaux 96 g/l pic de γ globulines à 49 g/l.

Lésions osseuses : lacunes craniennes, ostéoporose du bassin.

Malade n° 27

♀ de 81 ans. — Début en mars 1970, non traiteé.

hémogramme du 5-3-1970 : GR 1,8 M Hb 6,40 g Ht 17 % GB 5 100 avec 76 % PN Plaquettes 105 000/mm³

myélogramme du 5-3-1970 : 100 % de plasmocytes

V. S. : 160/165.

Protides totaux 120 g/l pic des γ globulines.

Protéinurie de Bence-Jones.

Géodes craniennes.

Malade n° 34

♂ de 80 ans. — Début en janvier 1970, non traité.

hémogramme du 10-6-1970 : GR 2,5 M Hb 8,6 g Ht 25 % GB 4 160 PN 69 %

myélogramme du 10-6-1970 : 11 % de granuleux, 8 % de la lignée rouge, 81 % de plasmocytes

V. S. : 142/145.

Protides totaux 105 g pic de γ globulines.

Signes osseux : géodes voûte cranienne, ostéoporose diffuse.

Présence de protéinurie de Bence-Jones.

Les plasmocytoses réactionnelles

Malade n° 28

♀ de 82 ans hospitalisée depuis janvier 1970 pour une cirrhose.

hémogramme du 13-3-1970 : GR 4,9 M Hb 15,05 g Ht 43 % GB 4 700 avec
86 % PN
1 % éosinophiles
7 % lymphocytes
6 % monocytes

myélogramme du 13-3-1970 : 66 % lignée granuleuse
18 % lignée rouge
7 % lympho. 2 % monocytes
7 % plasmocytes
moelle riche, polymorphe
les plasmocytes sont d'aspect normal

V. S. : 42/75.

Malade n° 29

♀ de 69 ans, hospitalisée depuis novembre 1969 pour une fièvre au long cours, le diagnostic porté est celui de collagénose.

hémogramme du 4-3-1970 : GR 3,6 M Hb 11,8 g Ht 33,5 % GB 9 600 avec
61 % PN 21 lympho.
3 % éosino
1 % boso
8 % plasmocytes
les plasmocytes paraissent normaux

myélogramme du 4-3-1970 : 63 % lignée granuleuse
24 % lignée rouge
3 % plasmocytes

V. S. : 115/143.
Augmentation du taux des IgG.

Malade n° 30

♂ de 8 ans, hospitalisé pour une érythroblastopénie aiguë post-glomemlonéphrite hématurique début mai 1970.

hémogramme du 5-5-1970 : GR 2,9 M Hb 8,1 g Ht 25 % GB 7 400
PN 36 % lympho. 59 %
monocytes 5 %
Plaquettes 300 000/mm³

myélogramme du 5-5-1970 : 72 % de granuleux
9 % de la série rouge
10 % de lymphocytes
1 % de monocytes
8 % plasmocytes

Présence d'un blocage érythroblastique.
V. S. : 31/78.

Affections diverses

Malade n° 31

♀ de 20 ans hospitalisée pour syndrome mononucléosique, le 11-5-1970. Les prélèvements ont été faits dans la première semaine de la maladie.

hémogramme du 11-5-1970 : GR 4,4 M Hb 13,6 g Ht 41 % GB 9 100 avec
29 % PN
2 % E.P.
9 % monocytes
1 % plasmocytes
51 % lympho. bleutés
4 % lympho. type II
7 % lymphocytes
Plaquettes 208 000/mm³

Nous n'avons pas pu faire le myélogramme.

Malade n° 32

♂ de 70 ans. — Atteint de maladie de Waldenström, dont le début apparent se situe en octobre 1969, traité par le chloraminophène.

hémogramme du 13-3-1970 : GR 3,9 M Ht 38 % GB 5 800 PN 59 %
PB 1 % lym. 32 % mono. 8 %

myélogramme du 13-3-1970 : 16 % plasmocytes
24 % lymphocytes
32 % granuleux
28 % série rouge
Mégacaryocytes : présents

Polyadénopathies. Hépatomégalie.
Immuno : agglutinines froides de spécificité anti I élevée.

Malade n° 33

♀ de 61 ans. — Atteinte du syndrome de Sezary ayant débuté en février 1970, pas de traitement en cours.

hémogramme du 7-4-1970 : GR 3,7 M Hb 10,5 g GB 12 600 PN 50 %
PE 1 % lym. 8 % mono. 16 %
cellules atypiques de Sézary 25 %
Plaquettes 50 000/mm³

myélogramme du 7-4-1970 : 59 % série granuleuse
23 % série rouge
9 % lymphocytes
3 % cell. réticulaires
6 % cell. de Sézary
Mégacaryocytes : présents

Ce matériel certes peu important nous a cependant permis de tirer des conclusions préliminaires nous encourageant à poursuivre ultérieurement nos recherches et à établir un protocole d'étude plus précis.

2. LE P.A.S. DANS LES CELLULES LYMPHOÏDES

Historique

La présence de glycogène, révélée par le P.A.S., dans les lymphocytes normaux ou pathologiques, a suscité de nombreux travaux. Wachstein (119) en 1949 semble avoir été le premier à s'intéresser à ce problème. Il a montré que dans 10 % environ des lymphocytes normaux la réaction du P.A.S. révélait des grains de glycogène. Etudiant des leucémies lymphocytaires, il trouve un taux sensiblement analogue à celui de ses témoins. Dempsey et Wislocki (22) et Gibb et Stowell (27) en 1949 également décrivent une discrète augmentation de la positivité dans les lymphocytes des lymphoses par rapport aux éléments normaux. Mitus (81) et all. en 1958, Astaldi et Varga (4) en 1957, décrivant un maximum de positivité dans les lymphocytes qu'ils appellent « immatures », découvrent également une augmentation de la positivité dans les lymphocytes leucémiques. Mitus, Berga, Mednicoff, Dameshek (81) font les mêmes constatations, tout en remarquant que cette positivité n'est pas le fait exclusif des lymphocytes de leucémies lymphocytaires, mais qu'on la rencontre dans d'autres affections lymphocytaires bénignes telles que le syndrome mononucléosique.

Quaglino et Hayhoe (90) en 1959 affirment également l'augmentation franche de la positivité dans les lymphocytes leucémiques, et constatent la diminution après thérapeutique lorsque le résultat en est satisfaisant. De même, la thèse de Hui en 1962 (52) inspirée par Heilmeyer (48) et par Merker (79) fixe le taux moyen normal observé chez les sujets de la clinique de Fribourg, à 22,9 %, et trouve une franche augmentation dans les lymphoses, avec un index moyen de 70 (la moyenne normale étant de 20), et un pourcentage de positivité de 45,7 % dans les lymphocytes de leucémiques. Heckner (47) et Björnberg (11) en 1963 notent également l'augmentation dans les cellules lymphocytaires des lymphoses avant traitement et Björnberg (11) constate que le contenu en glycogène de la cellule diminue parallèlement à l'effet du traitement sur le chiffre des lymphocytes du sang.

Citons parmi les travaux les plus récents : l'article de Crowther (20) en 1969 qui a étudié la positivité de lymphocytes normaux et de lymphocytes de différentes maladies : maladie de Hodgkin et cancers épithéliaux, au moyen d'une technique de concentration de lymphocytes du sang périphérique. En France, les articles de Zittoun (124), Najman (83), Grozdéa (33), la thèse de Hénon (49) et le mémoire de Gardais (26).

Technique

La technique choisie est celle de Mac Manus (75) avec modification de la contre-coloration.

Nous l'avons déjà exposée dans le chapitre II.

Résultats et interprétation

La positivité du P.A.S. se manifeste par la présence de fines granulations rouge-pourpre disposées en « collier de perles » dans le cytoplasme. Nous n'avons jamais observé la présence de grosses flaques irrégulières correspondant à la notation +++.

Le contrôle de la positivité de la réaction se fait par les polynucléaires qui ont une coloration diffuse, rouge, du cytoplasme, et par des lames témoins soumises à la digestion salivaire avant le bain d'acide périodique. Les polynucléaires sont alors négatifs.

Le décompte des cellules (lymphocytes ou plasmocytes) positives se fait sur 100. Nous avons préféré la notation par les croix et par les pourcentages, car elle rend mieux compte de la quantité de cellules correspondant à chaque stade de positivité.

Résultats chez les témoins

L'étude est effectuée chez 15 témoins dont 13 adultes numérotés de T 1 à T 13 et 2 enfants (n° T 14, n° T 15) n'ayant aucune affection clinique ou biologique.

Ces témoins sont groupés dans le tableau suivant :

P.A.S. des Témoins normaux

N° TEMOINS	LYMPHOCYTOSE SANGUINE	% DE POSITIVITE DES LYMPHOCYTES	DEGRE DE POSITIVITE
T 1	1638/mm³	1 %	+ (diffus)
T 2	987/mm³	0	0
T 3	840/mm³	2 %	+ (diffus)
T 4	1755/mm³	0	0
T 5	804/mm³	0	0
T 6	2220/mm³	0	0
T 7	1575/mm³	0	0
T 8	1922/mm³	0	0
T 9	1890/mm³	0	0
T 10	2013/mm³	1 %	+ (diffus)
T 11	2166/mm³	0	0
T 12	2480/mm³	0	0
T 13	1008/mm³	0	0
T 14	3294/mm³	0	0
T 15	2912/mm³	0	0

Conclusion

Il apparaît que les lymphocytes des témoins sont en général P.A.S. négatifs, les cellules P.A.S. positives sont très exceptionnelles. Ces résultats sont en accord avec ceux de Moretti, Veyret et Broustet (82) qui trouvent une moyenne de 2 % de lymphocytes positifs chez les sujets normaux, par contre ils s'écartent de ceux de Hui (52) qui observe une positivité dans 22 % des lymphocytes du sang périphérique normal.

Résultats dans les L.L.C.

Sur les 18 cas de L.L.C. présentés plus haut, 4 cas (nos 1, 7, 13, 17) étaient soumis à un traitement lors de l'examen cytochimique; ils sont indiqués par un astérisque (*).

Les malades sont numérotés de 1 à 18, il s'agit des malades présentés au début du chapitre.

P.A.S. des LLC

N° DU MALADE	LYMPHO-CYTOSE SANGUINE	LYMPHO-CYTOSE MOELLE	% DE LYMPHOCYTES (+) DU SANG	DEGRE DE POSITIVITE
1 (*)	1036/mm³	68 %	70 %	+
2	4418/mm³	88 %	50 %	+ à ++
3	5848/mm³	75 %	0	0
4	9890/mm³	41 %	82 %	+ à ++
5	12300/mm³	53 %	80 %	+
6	14400/mm³	75 %	91 %	+ à ++
7 (*)	14560/mm³	64 %	40 %	+
8	15600/mm³	80 %	88 %	++
9	18560/mm³	76 %	85 %	+ à ++
10	18792/mm³	45 %	89 %	+ à ++
11	22816/mm³	95 %	20 %	+
12	37864/mm³	93 %	100 %	+ à ++
13 (*)	39200/mm³	91 %	42 %	+
14	56550/mm³	86 %	24 %	+ à ++
15	78260/mm³	73 %	40 %	+
16	125440/mm³	86 %	94 %	+ à ++
17 (*)	275862/mm³	99 %	96 %	+
18	297984/mm³	83 %	25 %	+

La notation 0 à +++ est identique à celle exposée dans le paragraphe du P.A.S. chapitre II.

Dans ce tableau, nous n'avons mentionné que la positivité des lymphocytes du sang, et non celle de la moelle; car il est très difficile de reconnaître les cellules des différentes lignées, à moins qu'il n'y ait un taux de 90 % de lymphocytose médullaire ou plus (cas n° 6, n° 12, n° 16, n° 17); dans ces cas la positivité au P.A.S. est comparable à celle des lymphocytes du sang.

Conclusion

Sur 18 cas de L.L.C. on observe ainsi :

9 cas chez lesquels plus de 80 % des lymphocytes sont positifs. L'abondance de la positivité de la réaction dans les éléments considérés isolément, ne paraît pas avoir une relation avec l'abondance du pourcentage des éléments positifs;

3 cas se situent entre 20 % et 40 %;

1 seul cas est négatif. Ce sujet de 79 ans dont la maladie est connue depuis un an, qui n'a reçu aucune thérapeutique, a été, un mois avant notre examen, la victime d'une vaccination antivariolique intempestive, qui a déclenché une lésion locale ulcéreuse importante en voie de cicatrisation lente lorsque nous l'avons observée, et une augmentation très franche du groupe ganglionnaire axillaire du même côté que la vaccination faite sur le bras. Il est permis de se demander si la stimulation expérimentale ainsi faite ne joue pas un rôle dans la modification des lymphocytes. On constate en effet dans le sang un certain nombre de lymphocytes d'assez grande taille et bleutés. Nous nous proposons de suivre l'évolution de la réaction du P.A.S., au cours de l'évolution à distance de cet incident fâcheux.

Nous remarquons :

1. Que le traitement paraît peu influencer la positivité des lymphocytes et ce, contrairement aux données de Quaglino (90), de Zittoun (124) et de Björnberg (11), mais notre groupe est trop restreint pour que nous puissions être ferme sur ce point;

2. Que la positivité +++ (intense positivité avec gros blocs de P.A.S.) n'est jamais observée dans les lymphocytes leucémiques, ce fait est en parfait accord avec les descriptions antérieures;

3. Que l'hyperleucocytose très élevée ne paraît pas influencer ici le pourcentage des éléments positifs du sang. Tout au plus peut-on observer que la positivité des éléments trouvée chez les

sujets très hyperleucocytaires dépassant 100 000/mm³ est marquée d'une (+) seulement.

Hénon (49) dans sa thèse croit remarquer que la positivité décroît lorsque la leucocytose dépasse 100 000 leucocytes/mm³.

Résultats dans les Myélomes

Notre étude porte sur 9 cas de myélomes numérotés de 19 à 27, dont 3 seulement ont reçu un traitement avant le myélogramme (n° 19, n° 20, n° 25); ils sont signalés par un (*).

La réaction du P.A.S. fut faite sur la même série de lames ayant servi à l'hémogramme et au myélogramme.

Résultats :

Nous présentons les résultats sous forme de tableau où figurent : les malades numérotés par ordre croissant de plasmocytose médullaire, le chiffre de plasmocytose médullaire, le type de globuline sécrétée par le myélome, le pourcentage de plasmocytes positifs et le score de positivité. Notre étude porte seulement sur la lignée plasmocytaire.

P.A.S. dans les myélomes

N° du malade	Plasmocytose médullaire	Type globuline	% plasmo +	Score
N° 19*	12 %	Ig G	30 %	+
N° 20*	16 %	Ig A	0	0
N° 21	24 %	Ig A	0	0
N° 22	31 %	Ig G	0	0
N° 23	42 %	Ig G	0	0
N° 24	46 %	Ig G	0	0
N° 25*	46 %	Ig G	20 %	+
N° 26	58 %	Ig G	24 %	+
N° 27	100 %	Ig G	0	0

Conclusion

La positivité du P.A.S. dans les plasmocytes de myélomes que nous avons observés n'est que rarement constatée et elle est faible, puisqu'elle ne dépasse pas une croix.

Mais le nombre de cas étudiés est modeste. En effet, dans un travail récent, Grozdéa et collaborateurs (34) ont observé 18 myélomes et ont noté une élévation du score du P.A.S. sur les plasmocytes. Ils trouvent chez 10 malades non traités un taux de 31 à 89 % de plasmocytes P.A.S. +, alors que chez les sujets normaux le taux est de 2 à 5 % à peine. Chez un groupe de 4 malades dont le traitement paraît efficace, le P.A.S. est + à

75 à 98 %; tandis que chez 4 malades traités ne présentant pas d'amélioration clinique, ils trouvent les mêmes résultats que précédemment, sauf pour 2 malades qui ont un P.A.S. positivité à 100 %.

Nous n'avons pas étudié la positivité au P.A.S. des lymphocytes du sang de ces sujets atteints de myélome, ceci fera l'objet d'un travail complémentaire ultérieur.

Nous nous proposons donc, à la suite des constatations de Grozdéa, de reprendre l'étude du P.A.S. de nos myélomes et d'en suivre l'évolution chez chaque malade.

Il est à noter que dans 2 cas de plasmocytose réactionnelle (n° 28, n° 30), la réaction du P.A.S. sur les plasmocytes fut négative.

Résultats dans des affections diverses

Nous n'avons pu grouper que 3 cas comprenant : une mononucléose infectieuse (n° 31), une maladie de Waldenström (n° 32), un syndrome de Sézary (n° 33). Dans les résultats groupés dans ce tableau, nous ne mentionnons que la lymphocytose et la plasmocytose sanguines pour le n° 31, et la lymphocytose et la plasmocytose médullaires pour le n° 32.

N° MALADE	% LYMPH.	POSITIVE	SCORE	% PLASMO	POSITIVITE	SCORE	% CELLULES ATYPIQUES DANS LE SANG	POSITIVITE	SCORE
N° 31 M.N.I.	7 %	50 %	+	1 %	0	0	55 %	75 %	+
N° 32 W.	24 %	80 %	+	16 %	3 %	+			
N° 33 Sd S.							25 %	28 %	++

Conclusion

1. Dans la mononucléose infectieuse (n° 31), nous observons un pourcentage franchement élevé d'éléments lymphocytaires bleutés ou de plasmocytes dans le sang qui sont positifs à la réaction du P.A.S. avec une croix (+); l'examen eut lieu au cours de la première semaine de la maladie. Ce fait est connu, mais ce pourcentage franc s'oppose aux données de Crowther (20) qui trouve qu'après stimulation spontanée ou expérimentale (par le T.A.B.) les cellules hyperbasophiles et les plasmocytes du sang

de ces sujets ont un score P.A.S. normal ou très discrètement élevé.

2. Dans la maladie de Waldenström, les éléments sont nettement positifs. Ceci est connu ainsi que le souligne Basch (7) dans sa thèse. Nous n'avons pas observé d'enclave de P.A.S. dans les noyaux.

3. Les cellules du syndrome de Sézary dont on ignore la nature exacte sont généralement considérées comme des cellules histiocytaires. Ces cellules sont ici très positives quant au P.A.S. Nous nous interdisons de tirer des conclusions hâtives de cette seule observation; nous remarquons seulement que les histiocytes normaux sont faiblement P.A.S. (+) puisque Lennert (65) signale que 7 % des histiocytes normaux ont une réaction de P.A.S. positive et assez faible.

Enfin deux plasmocytoses ractionnelles d'une cirrhose (n° 28) et d'une moelle perturbée par une érythroblastopénie aiguë (n° 30) ont une absence totale de positivité au P.A.S.

Il est certain que ces deux observations sont tout à fait insuffisantes et que notre intention est d'étudier un plus grand nombre de plasmocytoses réactionnelles.

3. ÉTUDE DES NUCLÉOLES DES CELLULES LYMPHOÏDES

Historique

Depuis Pittaluga et Bessis (88) en 1944, Gonzalez-Guzmann (31) en 1948 puis en 1949, Undritz (117) en 1952, et Bessis (10) en 1956, de nombreux auteurs se sont intéressés à la morphologie des nucléoles dans les cellules du sang et des organes hématopoïétiques. La méthode utilisée est voisine de celle de Hœnel 1951 (50) utilisant le bleu de méthylène. C'est aussi le bleu de méthylène qu'utilisent Stokinger et Kellner (110) en 1952, ils attirent les premiers l'attention sur l'aspet différent que peuvent présenter les nucléoles des noyaux de lymphocytes : grand nucléole unique ou plusieurs petits nucléoles. Grundmann (39) en 1958 retrouve chez le rat ces deux types d'aspect nucléolaire dans les lymphocytes et leur attribue une grande valeur. Il pense que les lymphocytes macronucléolaires appartiennent aux nodules secondaires (lymphocytes folliculaires correspondant aux germinocytes de Lennert). Les lymphocytes micronucléolaires seraient les lymphocytes de la pulpe de Lennert ou lymphocytes des sinus de Grundmann. Les constatations retrouvées chez l'homme par Grundmann lui-même ont été reprises par les travaux de Begemann (Begemann, Rastetter et Fink) (9). Et dans son traité récent (8) Begemann expose sa méthode et ses résultats. Il conseille la technique de Stockinger et Kellner (110) faite conjointement à

la coloration par le P.A.S., et il observe que chez le sujet normal 75 à 78 % des lymphocytes sont macronucléolaires et 15 à 18 % sont micronucléolaires; les dépôts de P.A.S. paraissent plus fréquents dans les cellules pourvues de micronucléoles. La technique est intéressante mais elle est délicate, car il faut équilibrer les deux réactions et nous préférons les pratiquer isolément.

D'autres techniques sont proposées par Love (73), Salsbury (96), Smetana (104), puis Smetana et collaborateurs (102) qui a repris le bleu de toluidine. Smetana et collaborateurs (102) observent, dans les lymphocytes mûrs, un aspect en anneau : « ring-like », et dans les lymphocytes très jeunes un nucléole compact, ne possédant pas le centre clair des lymphocytes mûrs.

Kashiwada (61) a proposé une méthode par le bleu de crésyl brillant. Il observe minutieusement l'aspect des nucléoles de lymphocytes et les classe en trois types selon le degré d'infiltration du colorant dans le nucléole :

Type L : Nucléole coloré seulement en surface se traduisant par un aspect en anneau.

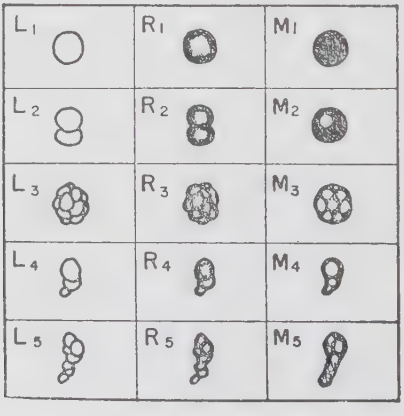
Type R : Nucléole dont la surface est colorée plus intensément que l'intérieur et donnant un aspect de nucléole légèrement teinté bordé par un liseré plus foncé.

Type M : Nucléole coloré uniformément, donnant un aspect « compact ».

Ces trois catégories se divisent en cinq sous-groupes selon la forme du nucléole :

— soit sphérique simple,
— soit double sphère,
— soit polysphérique,
— soit multivésiculaire, en forme de chapelet court ou long.

Il obtient ainsi quinze types différents de nucléoles, ce qui permet de classer toutes les hémopathies malignes dans le tableau suivant :



L'application de ces différentes données aux lymphocytes leucémiques a été faite par certains auteurs : Gonzalez-Guzman (31) n'observe pas de relation entre la morphologie des nucléoles et l'évolution de la maladie. Stokinger et Kellner (110) attirent l'attention sur l'augmentation des lymphocytes macronucléolaires dans les lymphocytes leucémiques. Ce fait est confirmé par Begemann (8) qui observe que 90 % des lymphocytes de L.L.C. sont macronucléolaires, la tendance inverse est observée dans les Waldenström, Hodgkin et Mononucléose Infectieuse. Smetana (105) observe que les nucléoles en anneau sont plus fréquents dans les lymphocytes de L.L.C. Kashiwada (61) enfin, trouve une prédominance des formes L de sa classification dans ces lymphocytes leucémiques.

Technique

Nous avons choisi la coloration par le bleu de toluidine, utilisée par Smetana (104). En effet, la méthode de Begemann, consistant à faire simultanément P.A.S. et coloration en bleu de méthylène pour les nucléoles n'a pas été retenue, en raison de la difficulté à équilibrer les deux colorations.

Les frottis de sang frais, prélevés sur sang capillaire ou veineux, sont séchés rapidement à l'air. On colore pendant deux secondes avec une solution de bleu de toluidine contenant :

1 partie de solution A,
50 parties de tampon phosphate pH 5.

La solution A se compose de :

500 mg bleu de toluidine,
100 mg alcool à 96 %.

Il n'y a pas de fixation préalable, elle se fait en même temps que la coloration. Il faut rincer la lame colorée avec une solution de tampon phosphate à pH 5.

— Laisser sécher à l'air.

Résultats et interprétation

Certains lymphocytes ont un nucléole bien visible et délimité par un liseré plus foncé, donnant l'aspect d'un anneau, avec centre clair (macronucléoles). Les autres lymphocytes ont deux ou trois petits nucléoles à la limite de la visibilité (micronucléoles). Très peu de lymphocytes présentent des nucléoles multivésiculaires.

Nous présenterons les résultats sous forme de tableaux :

Coloration Nucléolaire chez les Témoins

N° des témoins	Lymphocytose sanguine	% lympho macro-nucléolaire	% lympho micro-nucléolaire
N° T 1	1638/mm³	86 %	14 %
N° T 2	987/mm³	86 %	14 %
N° T 3	840/mm³	92 %	8 %
N° T 4	1755/mm³	88 %	12 %
N° T 5	804/mm³	90 %	10 %
N° T 6	2220/mm³	92 %	8 %
N° T 7	1575/mm³	87 %	13 %
N° T 8	1922/mm³	97 %	3 %
N° T 9	1890/mm³	96 %	4 %
N° T 10	2013/mm³	90 %	10 %
N° T 11	2166/mm³	90 %	10 %
N° T 13	1008/mm³	84 %	16 %
N° T 14	3294/mm³	84 %	16 %
N° T 15	2912/mm³	89 %	11 %

I. — Chez les témoins (les mêmes que ceux présentés pour la réaction du P.A.S.

Ils sont au nombre de 14. L'étude porte sur les lymphocytes du sang.

Donc tous les lymphocytes ont soit un gros nucléole en anneau (macronucléole) dans 85 % des cas environ, soit plusieurs petits nucléoles.

II. — Dans les L.L.C.

L'étude de la morphologie nucléolaire des lymphocytes porte sur 17 cas de L.L.C. ayant déjà servi à l'étude du P.A.S., et numérotés de 1 à 18 (le cas n° 9 n'ayant pas été étudié). Ces malades sont classés par ordre de lymphocytose sanguine croissante. Les cas traités sont signalés par un astérisque (*). Les résultats sont groupés dans le tableau suivant :

	LYMPHOCYTOSE SANGUINE	% LYMPHO MACRO-NUCLEOLAIRE	% LYMPHO MICRO-NUCLEOLAIRE
N° 1*	1036/mm³	97 %	3 %
N° 2	4418/mm³	88 %	12 %
N° 3	5848/mm³	90 %	10 %
N° 4	9870/mm³	83 %	17 %
N° 5	12300/mm³	90 %	10 %
N° 6	14400/mm³	96 %	4 %
N° 7*	14560/mm³	97 %	3 %
N° 8	15600/mm³	84 %	16 %
N° 10	18792/mm³	88 %	12 %
N° 11	22816/mm³	98 %	2 %
N° 12	37864/mm³	90 %	10 %
N° 13*	39200/mm³	95 %	5 %
N° 14	56550/mm³	85 %	15 %
N° 15	78260/mm³	96 %	4 %
N° 16	125440/mm³	60 %	40 %
N° 17*	275862/mm³	94 %	6 %
N° 18	297984/mm³	67 %	33 %

Les lymphocytes de la moelle ont le même pourcentage de macronucléoles et de micronucléoles que les lymphocytes du sang, et l'aspect en est identique; nous ne les avons donc pas mentionnés.

La coloration nucléolaire sur un frottis de moelle ne fut faite que lorsque la lymphocytose médullaire atteignait des taux de 90 % et plus.

III. — Dans les myélomes.

L'étude des nucléoles a été faite sur les myélomes n^{os} 19, 20, 21, 26 et seulement sur les plasmocytes.

MALADE N°	PLASMOCYTOSE MEDULLAIRE	NOMBRE DE PLASMOCYTES A GROS NUCLEOLE COMPACT	NOMBRE DE PLASMOCYTES A NUCLEOLES EN ANNEAU
N° 19*	12 %	3	9
N° 20*	16 %	2	14
N° 21	24 %	5	19
N° 26	58 %	20	38

Les n^{os} 19 et 20 étaient sous traitement lors de l'examen.

Le nombre de plasmocytes à gros nucléoles compacts est déterminé sur 100 cellules du myélogramme lors du décompte. De même pour les plasmocytes à nucléole en forme d'anneau.

IV. — Dans des affections diverses.

1) Le syndrome mononucléosique (cas n° 31) :

Sur 100 lymphocytes comprenant
78 % de grands lymphocytes bleutés et
22 % de petits lymphocytes,

On observe :
— dans les grands lymphocytes
11 % ont 2 à 7 gros nucléoles,
67 % ont plusieurs petits nucléoles:
— dans les petits lymphocytes
4 % ont 2 à 3 nucléoles moyens,
18 % ont un gros nucléole en anneau.

2) Le syndrome de Waldenström (cas n° 32) donne ici un aspect tout à fait semblable à ce qui est observé dans le sang normal.

3) Dans la maladie de Sézary (cas n° 33), parmi les cellules inclassables :

46 % sont macronucléolaires,
13 % micronucléolaires,
41 % multinucléolaires en grappe.

Conclusion

Sur 17 cas de L.L.C., 10 cas ont une augmentation franche du pourcentage de lymphocytes macronucléolaires et ce, quel que soit le stade d'évolution apparente de la maladie avant tout traitement (cas nos 3, 5, 6, 11, 12, et n° 15), ou traités déjà de façon plus ou moins longue par le chloraminophène (cas n°1, n° 7, n° 13, n° 17); quelle que soit aussi la lymphocytose absolue du sang qui va de 1 036 à 297 984/mm³.

Il est à noter que ces 10 cas avaient un pourcentage de lymphocytes macronucléolaires égal ou supérieur à 90 %.

Ces nucléoles de grande taille sont habituellement uniques et en anneau (9 cas sur 10). Dans un seul cas (n° 7), un aspect tout à fait inhabituel a été observé; il s'agissait de véritables amas de grands nucléoles clairs donnant un aspect de grappe ou de « morula ». Ces nucléoles se répartissaient de la façon suivante :

54 % ayant 1 seul nucléole en anneau,
21 % ayant 1 nucléole bivésiculaire,
22 % ayant 1 nucléole multivésiculaire.

Ces nucléoles atypiques se devinaient déjà au M.G. Giemsa. Cet aspect n'a jamais été vu chez les témoins normaux.

5 cas avaient un pourcentage de lymphocytes macronucléolaires supérieur à 80 % (cas n° 2, n° 4, n° 10, n° 8, n° 14), et 2 cas seulement avaient 60 % et 67 % (n° 16 et n° 18) de lymphocytes macronucléolaires, se situant dans la frange inférieure de la normale (ces malades n'ont pas de particularité clinique ou cytologique). On peut remarquer que la leucocytose ne joue certainement pas un rôle, car dans un cas la leucocytose est à peine supérieure à la normale (cas n° 1) et dans l'autre elle est la plus élevée de toute notre série (n° 18).

Bornons-nous à constater que dans ces lymphoses, l'augmentation du pourcentage des lymphocytes monomacronucléolaires est donc fréquente, mais qu'elle n'est pas constante.

Quant aux myélomes, certains auteurs ont déjà signalé la présence de nucléoles dans les cellules mûres des lignées plasmocytaires, soit chez des sujets normaux, soit chez des sujets atteints d'hémopathies malignes (Gonzalez-Guzman en 1948 (31), Hœnel en 1951 (50), Stokinger et Kellner en 1952 (110), Smetana en 1961 (104), et Smetana et all. en 1966 (103).

Nous avons observé dans les plasmocytes de ces myélomes, un pourcentage important de gros nucléoles en forme d'anneau, avec un contour plus épais que celui des nucléoles observés dans les lymphocytes. Quelques plasmocytes présentaient un gros nucléole d'aspect trabéculaire et quelquefois très dense et compact. Smetana (103) pense qu'il s'agit dans ce cas de plasmocytes très jeunes (proplasmocytes), mais il fut très difficile de donner des précisions sur le stade de maturation cellulaire.

Dans le syndrome mononucléosique (n° 31), on note la grande fréquence de lymphocytes micronucléolaires. Ce fait est important, car il va avec l'assertion de Begemann (9) que le pourcentage des lymphocytes micronucléolaires augmente d'une façon très franche dans les états infectieux inflammatoires réactionnels. Si ce fait est vérifié sur une série importante, nous aurions là un élément de diagnostic de la plus haute importance pour reconnaître la signification d'une lymphocytose sanguine normale ou discrètement atypique mais donnant une lymphocytose absolue à peine élevée. Nous nous proposons naturellement d'étudier une forte série de lymphocytoses considérées comme leucémiques ou réactionnelles en y incluant naturellement tous les syndromes mononucléosiques que nous pouvons rencontrer.

Dans le syndrome de Waldenström (cas n° 32), on note un aspect tout à fait semblable à ce qui est observé dans le sang normal. Ce point est important, car bien qu'il y ait encore contestation sur la nature de la cellule du Waldenström, on pense de plus en plus qu'il faut abandonner le concept de petite cellule réticulaire lymphoïde que K. Röhr (93) avait grandement popularisée au profit d'une prolifération de lymphocytes anormaux. Constatons seulement que dans cette unique observation, l'aspect

nucléolaire n'est pas celui qu'on observe dans les leucémies lymphocytaires habituelles.

Dans la maladie de Sézary (cas n° 33), il est impossible de tirer des conclusions très fermes, il faut seulement noter que nous n'avons jamais observé un tel aspect de nucléole en grappe dans les lymphocytes normaux, que nous n'avons vu que dans un seul cas d'une leucémie lymphocytaire très atypique, et que selon Kishawada (61), un tel aspect morulaire se rapproche de ceux que l'on observe dans les réticulosarcomes qu'il a pu étudier. Il serait cependant imprudent de voir là un argument très fort en faveur de la nature réticulohistiocytaire de ces cellules de Sézary.

4. ÉTUDE DES DESHYDROGENASES DANS LES LLC

Définition

La lacticodéshydrogénase (L.D.H.) est une enzyme du cycle citrique et joue un rôle dans la formation d'acide lactique au cours de la glycolyse. Elle est constituée de cinq iso-enzymes tandis que la succino-déshydrogénase (S.D.H.) catalyse la réaction succinate-malate.

La mise en évidence de plusieurs déshydrogénases par la méthode cytochimique est possible si on permet à la cellule d'agir sur un substrat approprié, en présence d'un accepteur d'hydrogène (sels de tétrazolium qui donnent un précipité de formazan insoluble sous forme de grains bleu foncé).

Historique

Parmi les premiers travaux effectués (portant sur la S.D.H.) on peut citer ceux de Seligman et Rutemberg 1951 (100), de Iwao Hirono en 1956 (54), de Farber, Sternberg et Dunlap (24) sur coupes histologiques.

De Souza et Kothare (108) en 1959 mettent en évidence la S.D.H. dans les polynucléaires neutrophiles du sang humain.

Mais la grande difficulté de ces réactions était d'obtenir un précipité à l'intérieur de la cellule. Ce fut possible grâce à Tsoucheng, Nachlas, Seligman en 1956 (116) qui introduisirent la technique du N.B.T. p nitrophényl ditétrazol) qui forme un précipité de formazan sous forme de grains colorés à l'intérieur de la cellule.

Mais ces études furent longtemps difficiles en raison des problèmes de fixation cellulaire.

En effet les déshydrogénases, d'une part diffusent aisément dans le milieu extracellulaire et d'autre part s'inactivent spontanément et très rapidement. Il fallait donc trouver une fixation légère des cellules, ne provoquant pas l'inactivation enzymatique, mais conservant une morphologie cellulaire nette.

Différentes fixations ont été proposées, dans le seul but de ménager cette activité enzymatique très labile.

Novikoff et Masek (84) préconisent la fixation par une solution de formol-calcium, tandis que Kaplow et Burstone (59) préfèrent la fixation à l'acétone tamponnée acide.

En 1960 Quaglino et Hayhoe (9) conseillent la fixation à l'acétone à 60 % pendant une durée de 30 secondes à une minute, ceci permet de dissoudre les lipides qui pourraient fixer en artéfact les grains de formazan.

Pour éviter la diffusion des enzymes hors de la cellule, Scarpelli et Pearse (97) utilisent le polyvinil-pyprolidone (P.V.P.) dans la solution d'incubation (pour L.D.H. et G.6P.D.). Ils obtiennent ainsi une diffusion très faible des enzymes hors de la cellule.

Stuart et Skowron (112) fixent les frottis à l'éthanol à 70°, mais ceci est difficilement applicable en pratique courante. Ainsi, dans la multiplicité de ces techniques proposées, nous avons retenu celle de Hayhoe exposée dans son traité intitulé *The cytologie and Cytochemisty of Acute lenkemias* (43), avec quelques modifications de la fixation et de la contre-coloration des noyaux.

Technique

1) Faire des frottis minces, rapidement séchés à l'air.

2) Fixer les frottis une à deux heures au plus tard après le prélèvement en les plongeant dans un bain d'acétone absolu, refroidi à + 4 °C, pendant une minute. En effet cette fixation utilisée par Melnick (78) pour les coupes histologiques s'est avérée être la plus efficace.

3) Retirer les lames du bain, les laisser sécher à l'air. Les lames peuvent être conservées au réfrigérateur jusqu'au moment de la coloration, mais le délai ne doit pas dépasser un à deux jours, sous peine d'inactivation enzymatique.

4) Incuber à l'étuve à 37° pendant deux heures dans la solution suivante :

a) Pour la succino-déshydrogénase :

Tampon phosphate 0,2 M ph 7,4.....	10 ml
Succinate de sodium 0,2 M.....	10 ml

Bicarbonate de sodium 0,6 M.....	2 ml
Chlorure de calcium 0,03 M.....	0,2 ml
Chlorure d'aluminium 0,03 M.....	0,2 ml
Nitro-BT 10 mg dans.....	10 ml
Eau distillée jusqu'à.....	40 ml

b) Pour la lactico-déshydrogénase :

Tampon phosphate 0,2 M ph 7,2.....	10 ml
Lactate de sodium 0,2 M.....	10 ml
DPN.....	10 mg
Nitrite de sodium 0,1.....	1,5 ml

Nitro-BT 10 mg dans 10 ml d'eau distillée.
PVP : 350 mg par 10 ml

Il est important de préparer extemporairement la solution d'incubation. On peut préparer les solutions tampons d'avance, mais on doit les maintenir au froid (+ 4 °C) et vérifier le pH au moment de l'emploi.

5) Rincer à l'eau distillée, laisser sécher.

6) Contre-colorer pendant deux heures dans une solution de Kernechrot préparée ainsi :

0,1 g de poudre dans 100 ml d'une solution de sulfate d'aluminium à 5 %, porter à ébullition, laisser refroidir, filtrer.

7) Rincer les lames.

8) Laisser sécher à l'air.

9) Lire les lames assez rapidement car l'intensité de la coloration diminue nettement.

Certains auteurs préconisent l'adjonction de phénazine méthosulfate (PMS) à la solution d'incubation (Farber et Louvière) (23) le PMS étant un transporteur d'électrons, il faciliterait la mise en évidence des déshydrogénases en l'absence de diaphorase endogène. Mais ceci est controversé par Chason et Pearse (19), qui trouvent des résultats opposés. Ils concluent que les dépôts de formazan sont dus à des artéfacts, tandis qu'Hashimoto (40) pense que le PMS peut supprimer l'activité des déshydrogénases lorsqu'on l'utilise à de mauvaises concentrations. Bohn (13) fait une étude comparée avec et sans PMS et trouve que la réaction sans PMS est moins intense mais plus nette, donc mieux interprétable.

Nous avons préféré ne pas l'utiliser.

Résultats et interprétation

Il est important, comme nous l'avons déjà dit, de lire les lames le plus rapidement possible après la coloration, car les grains de

formazan diffusent hors de la cellule, rendant le décompte ainsi très délicat.

Le montage des lames dans le glycérol-gélatine évite cette diffusion mais atténue la couleur du frottis.

Ainsi, la positivité des L.D.H. et des S.D.H. se manifeste par la présence de grains fins ou plus grossiers, bleu foncé, ou bien par une coloration diffuse du cytoplasme en bleu-violet.

Ces grains sont souvent groupés dans un coin du cytoplasme pour les lymphocytes, et répartis dans toute la cellule pour les polynucléaires et les monocytes.

Dans les plasmocytes, les grains sont beaucoup plus gros, plus épais, et groupés préférentiellement dans la zone du Golgi ou quelquefois au bord du cytoplasme, formant un liseré.

En 1958, Wegman (123) localise les DH dans les mitochondries mais la spécificité de la réaction fut mise en doute par Ackerman (1) et Marcuse et Cochran (77), qui obtinrent une réaction positive même en l'absence de substrat dans la solution d'incubation. Cependant Balogh et Cohen (6) obtinrent une réaction négative en l'absence de substrat et démontrèrent la spécificité de plusieurs déshydrogénases. Nous faisons donc à chaque réaction une lame témoin en l'incubant dans la solution sans le substrat, elle montre une réaction négative par absence de grains de formazan.

La notation adoptée est la suivante :

- 0 : absence de grains ou de coloration diffuse;
- + : présence de quelques grains fins (< 10) ou teinte diffuse bleu-violet du cytoplasme;
- ++ : paquet de grains bien nets (entre 10 et 20) ou grains plus gros dispersés dans toute la cellule;
- +++ : très nombreux grains (> 20) rassemblée en amas denses.

Mähr (76) propose un indice permettant une meilleure comparaison des différents résultats. Cet indice s'exprime par le rapport :

$$\frac{(\text{Nbr. de cell. de notation } ++) \times 2 \quad (\text{Nbr. de cell. dénota.. } \times 1}{100}$$

Nous préférons l'emploi d'un indice voisin en ajoutant au numérateur le nombre de cellules ayant une notation +++ multiplié par 3.

Exemple : témoin n° 1

16 % de cellules ont une positivité +++
40 % de cellules ont ++
44 % de cellules ont +

$$\text{L'indice sera} = \frac{(16 \times 3) + (40 \times 2) + (44 \times 1)}{100} = 1{,}72$$

Pour la série de témoins l'indice ainsi calculé varie entre 1,66 et 2,71.

Notation

1) *Les L.D.H. :*

Tous les lymphocytes sont positifs, la notation allant de + à +++ et l'indice de : 1,66 à 2,71.

Les polynucléaires neutrophiles sont négatifs ou + à -+ avec des grains dispersés dans toute la cellule.

Les monocytes sont positifs à une croix ou deux croix avec grains dispersés ou coloration diffuse.

Les plasmocytes ont des grains massifs souvent groupés.

Les plaquettes sont toujours très positives, avec à la fois une coloration diffuse et deux ou trois grains bleu foncé, et peuvent servir de témoin à la réaction.

2) *Les S.D.H. :*

L'aspect de la positivité en grains est le même que pour les L.D.H., avec toutefois une positivité plus faible et plus souvent diffuse. On trouve un certain pourcentage de cellules négatives, l'indice varie de 1,14 à 1,97.

Gough et Elves (32) trouvent la même positivité pour les leucocytes du sang normal et une augmentation de cette positivité pour les lymphocytes stimulés par la P.H.A.

Résultats chez les témoins

Il s'agit des mêmes témoins pris pour les réactions précédentes et numérotés de T 1 à T 15 (les n^{os} 10, 12 et 8 n'ont pas été étudiés).

Résultats dans les L.L.C.

Les malades au nombre de 18 sont ceux qui ont déjà été étudiés pour les réactions précédentes.

Nous avons mentionné seulement la positivité des lymphocytes du sang, car il est difficile de reconnaître les différentes cellules par cette coloration, et le décompte des éléments médullaires serait inexact.

Nous l'avons cependant pratiqué chaque fois que la lymphocytose médullaire était supérieure à 80 %. Il est alors très facile de classer les cellules et chaque fois la positivité était égale à celle du sang.

Les résultats des lactico et succinic-déshydrogénases sont présentés dans le tableau suivant comme pour les témoins.

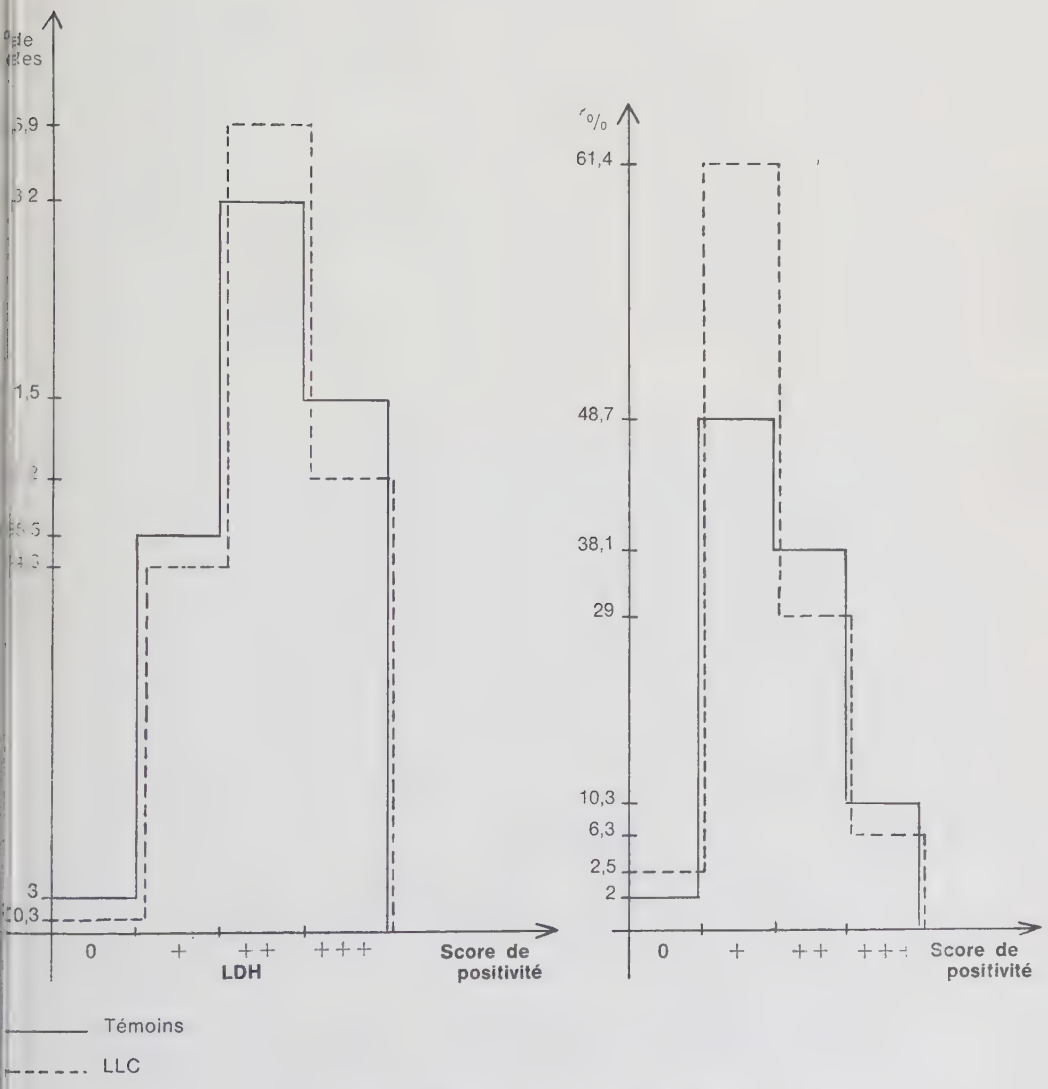
Quatre cas (n° 1, n° 7, n° 13, n° 17) étaient sous traitement lors de notre examen; ils sont signalés par (*).

N° TEMOIN	LYMPHOCYTOSE SANGUINE	DEGRE DE POSITIVITE SUR 100 CELLULES				INDICE	POSITIVITE DE SDH SUR 100 CELLULES				INDICE
		0	+	++	+++		0	+	++	+++	
T 1.	1638/mm³		44	40	16	1,72		58	45	3	1,57
T 2.	987/mm³		20	50	36	2,28		38	54	12	1,82
T 3.	840/mm³		3	20	76	2,71	5	29	46	20	1,81
T 4.	1755/mm³		17	38	45	2,28	2	50	44	4	1,50
T 5.	804/mm³		38	40	22	1,84					
T 6.	2220/mm³		15	43	42	2,27		52	40	8	1,56
T 7.	1575/mm³		20	59	22	2,04		55	35	10	1,55
T 9.	1890/mm³		44	46	10	1,66	8	72	18	2	1,14
T 11.	2166/mm³		18	74	8	1,90		68	20	12	1,56
T 13.	1008/mm³		24	33	43	2,19		28	47	25	1,97
T 14.	3294/mm³	3	29	32	36	2,01	8	42	36	14	1,56
T 15.	2912/mm³		34	44	22	1,88		44	42	14	1,56

Tableau n° 4
L.D.H. et S.D.H. dans les L.L.C.

N° du malade	Lymphocytose sanguine	% positivité LDH				Indice	% positivité SDH				Indice
		0	+	++	+++		0	+	++	+++	
N° 1*	1036/mm³		20	32	48	2,28	2	52	40	6	1,5
N° 2	4418/mm³		47	45	8	1,61					0
N° 3	5848/mm³		38	42	20	1,82		100	(diffus)		1
N° 4	9890/mm³		18	13	69	2,07	10	58	25	7	1,29
N° 5	12300/mm³		12	68	20	2,08		100	(diffus)		1
N° 6	14400/mm³		14	60	26	1,86			cellules lysées		
N° 7*	14560/mm³		21	46	33	2,12		100	(diffus)		1
N° 8	15600/mm³		30	66	4	1,62	5	65	30		1,15
N° 9	18560/mm³		26	48	26	2	16	48	28	8	1,28
N° 10	18792/mm³		27	43	30	2,03		34	58	8	1,54
N° 11	22816/mm³		26	56	18	1,92		51	40	9	1,58
N° 12	37864/mm³		24	46	30	2,10		23	48	29	2,06
N° 13*	39200/mm³	4	28	52	20	1,92		32	50	18	1,86
N° 14	56550/mm³		19	44	37	2,18		32	54	14	1,82
N° 15	78260/mm³		28	30	30	1,78		100	(diffus)		1
N° 16	125440/mm³		30	55	15	1,85	8	52	35	5	1,37
N° 17*	275862/mm³		26	37	37	2,11		100	(diffus)		1
N° 18	297984/mm³		10	60	30	2,20		36	56	8	1,72

On peut présenter les résultats sous forme d'histogramme sur lequel on porte en abscisse la valeur du score de positivité et en ordonnée le pourcentage des cellules ayant un score donné (ce pourcentage est obtenu en faisant une moyenne du nombre de cellules dans chaque colonne de score 0, +, ++, ou +++).



HISTOGRAMMES DES DÉSHYDROGÉNASES

Conclusion

L'indice obtenu dans les L.L.C. varie entre 1,61 et 2,28 pour les L.D. et entre 1 et 2,06 pour les S.D. On note donc une légère baisse de positivité des S.D. par rapport aux L.D., mais peu de différences par rapports aux témoins.

Hayhoe (43) avait déjà affirmé qu'il n'y a pas de différence entre l'activité des déshydrogénases de sujets leucémiques, à condition que la comparaison soit faite entre cellules de même lignée et au même moment de maturation. Mähr (76) constate qu'il y a une augmentation de son indice dans les L.L.C. par rapport aux témoins.

Il faut tenter d'expliquer ces résultats discordants. Il est intéressant de noter que des études électrophorétiques sur les déshydrogénases faites par plusieurs auteurs (109) (15) montrent une répartition différente des iso-enzymes I, II, IV et V chez les sujets normaux et chez les L.L.C.

Starkweather (109) constate que dans les leucocytes de L.L.C. l'iso-enzyme n° III est fortement élevée par rapport à celle des leucocytes de sujets normaux chez lesquels prédomine l'iso-enzyme n° V.

Bottomley, Locke, Ingram (15) trouvent une nette augmentation de l'iso-enzyme n° III, mais pas de différence entre la vitesse de migration de l'iso-enzyme de sujet normal et de sujet pathologique.

Il n'est pas possible de conclure; nous retenons seulement que la technique de cytochimie pratiquée ici ne nous apporte aucun élément pour le diagnostic.

Nous avons complété ce travail par une étude des déshydrogénases lactiques et succiniques dans les plasmocytes de myélomes (malades n^{os} 19, 20, 21), tous les plasmocytes étaient très fortement positif à trois croix avec de gros grains épais groupés très souvent au niveau du Golgi.

Nous nous proposons de poursuivre l'étude systématique de ces deux déshydrogénases dans les cellules lymphoïdes en y adjoignant la dihydroorotic déshydrogénase (DHO) selon la méthode de Castoldi, Yam et Mitus (18).

En effet, cette déshydrogénase, présente dans toutes les cellules du sang et de la moelle, excepté dans les érythrocytes mûrs, serait nettement augmentée dans les neutrophiles des L.M.C. et dans les lymphocytes des L.L.C., dans les lymphosarcomes et la maladie de Hodgkin.

L'appréciation de ces trois activités enzymatiques sera régulièrement répétée au cours de l'étude des L.L.C. et des myélomes.

5. LES ESTÉRASES NON SPÉCIFIQUES DANS LES PLASMOCYTES DE MYÉLOME

Nous n'exposerons ni l'historique ni la technique choisie, en effet nous l'avons déjà fait dans la première partie de ce travail, avec les techniques cytochimiques courantes.

Nous signalerons cependant que Löffler (67), Braunsteiner (16), Leder (62) ont surtout fait porter leurs efforts sur l'étude des éléments de la série monocytaire. Dans les cellules lymphocytaires et plasmocytaires, l'étude de l'estérase n'a trouvé jusqu'ici que peu d'intérêt. Dans les lymphocytes même, ces estérases sont considérées comme absentes. Lennert (page 76 de son traité) (65) indique qu'une méthode d'étude sur naphtol AS acétate, avec un temps d'incubation prolongé, lui aurait montré dans une étude faite avec Löffler mais non publiée, une certaine positivité; mais dans les plasmocytes, l'activité s'est révélée avoir un certain intérêt ainsi qu'en font foi les différentes études, dont celles de Szmigielski (114).

Résultats

Notre étude porte sur neuf cas de myélomes numérotés de 19 à 27 par ordre croissant de plasmocytose médullaire, et sur trois cas de plasmocytose « réactionnelle » servant de témoins (nos 28, 29, 30).

La réaction effectuée sur les lymphocytes de sujets normaux s'est révélée négative ou très faiblement positive (réduite à un grain).

I. — *Chez trois sujets présentant une plasmocytose « réactionnelle »*

N° MALADE	PLASMOCYTOSE MEDULLAIRE	% DE PLASMOCYTES POSITIFS	REPARTITION DE LA POSITIVITE SUR 100 PLASMOCYTES		
			+	++	+++
N° 28	7 %	76	40	32	4
N° 29	6 %	70	48	18	4
N° 30	8 %	81	25	25	31

Le décompte est effectué sur 100 cellules.

On observe donc un grand pourcentage d'éléments positifs. Cependant, les plasmocytes à très forte activité enzymatique ne dépassent pas 31 %. D'autre part, la positivité de ces plasmocytes à l'estérase naphtol AS n'est pas modifiée par l'adjonction de fluorure de sodium.

II. — *Chez les sujets atteints de myélome*

N° DES MALADES	PLASMOCYTOSE MEDULLAIRE	% DE PLASMOCYTES POSITIFS	REPARTITION DE LA POSITIVITE SUR 100 PLASMOCYTES			
			0	+	++	+++
N° 19*	12 %	71	29	40	29	2
N° 20*	16 %	92	8	34	44	14
N° 21	24 %	100	0	0	24	76
N° 22	31 %	100	0	3	22	75
N° 23	42 %	100	0	4	20	76
N° 24	46 %	100	0	0	19	81
N° 25	46 %	100	0	1	19	80
N° 26	58 %	100	0	8	20	72
N° 27	100 %	97	3	13	49	35

N° 19+ et n° 20+ étaient traités lors de l'examen.

On note une forte augmentation de l'activité enzymatique des estérases dans les plasmocytes de ces myélomes par rapport aux témoins.

Conclusion

Sur ces neuf myélomes, la positivité dépasse dans tous les cas 90 %, et atteint 100 % dans six cas, et la positivité dans les cellules considérées isolément est très considérable, puisque 80 % des éléments méritent trois +++ dans deux cas (n° 24, n° 25) et dépasse 70 % dans quatre cas (nos 21, 22, 23, 26). Dans les deux cas traités, le chiffre n'atteint pas 15 % (n° 19, n° 20). Alors que chez les témoins, nous obtenons un pourcentage plus modeste, mais avec une positivité qui se situe à une croix (+) pour la plupart des éléments.

6. PHOSPHATASES ACIDES

La première étude histochimique de l'activité enzymatique des cellules a été mise au point par Gomori (30). Mais cette technique déjà ancienne a laissé place aux techniques plus précises en cytologie, de coloration par diazocouplace.

Goldberg et Barka (28), Kaplow et Burstone (60) ainsi que Löffler (70), Schmalzl et Braunsteiner (1906), Leder (62) et Rosenzajn (95) ont décrit dans les différents organes hématopoïétiques l'activité en phosphatases acides des diverses cellules.

Parmi toutes les techniques décrites nous avons retenu celles de Goldberg et Barka (28) utilisant pour substrat le naphtol AS BI phosphate et pour colorant un dérivé de la pararosaniline. Cette méthode que nous avons légèrement modifiée nous a donné satisfaction sur le plan de la précision de la localisation de l'enzyme et de la reproductibilité des résultats.

Technique

Fixation des frottis de sang de moelle ou de ganglion séchés à l'air, dans une solution à 40 C d'acétone à 60 % pendant 30 secondes. Rincer à l'eau distillée.

Cette fixation doit être effectuée le plus rapidement possible après le prélèvement, au plus tard 48 heures après celui-ci.

Incubation de 90 minutes à 37° dans un milieu tamponné à pH 5 contenant le substrat et le sel de diazonium.

Ce milieu, préparé extemporairement, est composé de la façon suivante, à partir de quatre solutions stock : A, B, C, D.

Sol. A : Tampon Michaelis véronal, 9,71 g d'acétate de sodium $3H_2O$ ajoutés à 14,71 g de barbiturate de sodium que l'on dissous dans l'eau distillée et déminéralisée jusqu'à un volume final de 500 ml.

Sol. B : Naphtol AS BI phosphate (produit NBCo) dissous dans l'acétone pur à la concentration de 10 ml.

Sol. C : Nitrite de sodium à 4 % dans l'eau distillée.

Sol. D : Pararosaniline hydrochloride (National aniline division, Allied chemical and Dye Corporation New York), 2 g de la poudre sont dissous dans 50 ml d'acide chlorhydrique 2N en chauffant doucement. Filtrer la solution après refroidissement. Conserver ces quatre solutions stock à 4 °C.

Le milieu d'incubation contient :

— 5 ml de sol. A,
— 1 ml de sol. B + 13 ml d'eau distillée,

— 1,6 ml d'hexazonium pararosaniline obtenu en mélangeant dans un autre récipient
— 0,8 ml de sol. C,
— 0,8 ml de sol. D.

Après avoir ajouté ces solutions dans l'ordre décrit, on ajuste le pH du milieu d'incubation à 5 avec de la soude.

Rincer les lames à l'eau distillée et contre-colorer par le vert de méthyle à 1 % pendant 30 à 60 secondes.

Laver abondamment, sécher.

Résultats et interprétation

L'activité enzymatique se manifeste sous la forme de granulations d'un rouge très vif dans le cytoplasme des cellules dont le noyau est coloré en vert.

Pour essayer d'apprécier l'intensité de cette activité nous avons réparti les éléments positifs en trois catégories, arbitraires :

\+ : moins de 10 grains dans la zone du Golgi.
++ : 10 à 20 grains, ou moins de 10 très grosses granulations.
+++ : plus de 20 grains ou 10 à 20 très grosses granulations.

Résultats chez les témoins

1) Pour les lymphocytes nous n'avons observé qu'une positivité très faible (un seul grain) ou nulle dans le sang périphérique des sujets normaux.

2) Pour les plasmocytes nous avons étudié la moelle osseuse de deux séries de malades : les uns ayant une plasmocytose réactionnelle, les autres atteints de myélome (huit cas).

Ces résultats sont groupés dans les deux tableaux suivants :

PHOSPHATASES ACIDES DANS LES PLASMOCYTOSES RÉACTIONNELLES

N° MALADE	PLASMOCYTOSE MEDULLAIRE	% DE PLASMOCYTES POSITIFS	REPARTITION DE LA POSITIVITE SUR 100 PLASMOCYTES		
			+	++	+++
N° 28	7 %	100 %	16	65	19
N° 29	6 %	98 %	30	34	34
N° 30	8 %	98 %	10	49	39

Donc positivité de tous les plasmocytes, mais cette positivité très nette reste modérée puisque moins de 40 % des éléments ont une très forte activité +++.

PHOSPHATASES ACIDES DES MYÉLOMES

N° MALADE	PLASMOCYTOSE MEDULLAIRE	% DE PLASMOCYTES POSITIFS	REPARTITION DE LA POSITIVITE SUR 100 PLASMOCYTES		
			+	++	+++
N° 20	16 %	100 %	1	19	80
N° 21	24 %	100 %	2	22	76
N° 22	31 %	100 %	0	12	88
N° 23	42 %	100 %	0	2	98
N° 24	46 %	100 %	0	17	83
N° 25	46 %	100 %	1	19	80
N° 27	100 %	100 %	1	21	78
N° 34	81 %	100 %	0	11	89

Seul le malade n° 20 était traité.

Conclusion

Il apparaît donc que la positivité des phosphatases acides, nette mais modérée dans les plasmocytes normaux « réactionnels », est ici très exagérée : tous les plasmocytes observés ont une activité décelable, très rares sont ceux qui ont une activité notée d'une croix (maximum 2 %, alors que chez les témoins 10, 16, 30 % sont ainsi classés), peu nombreux sont ceux qui sont estimés positifs à deux croix (2 à 22 %, alors que chez les témoins on observe 34, 49 et 65 %). Les cellules intensément positives jusqu'à trois croix prédominent nettement (le pourcentage étant de 76 % à 98 %), alors que chez les trois témoins il est seulement de 19, 34 et 39 %.

On peut donc conclure avec Merker (79) et Löffler (68) que le score de positivité des phosphatases acides est nettement augmenté dans les plasmocytes de plasmocytome et ce, quel que soit l'aspect de ces plasmocytes, l'évolution de la maladie et le traitement antérieurement subi.

7. ÉTUDE DE L'ADENOSINE TRIPHOSPHATASE

Historique

Cette réaction enzymatique fut décrite par Gomori (29). Plusieurs auteurs dont Wachstein et Meisel (122), puis Schubert (98) y ont apporté des modifications diverses.

Dans un grand nombre de travaux, on signale les modifications de l'activité de cette enzyme dans les plasmocytes normaux et pathologiques (14) (16) (17).

Technique

Nous avons utilisé la technique décrite par Schubert (98) en utilisant comme substrat l'ATP.

Fixation des frottis de sang ou de moelle par les vapeurs de formol pendant 10 minutes. (Cette fixation ne devra pas être effectuée plus de 48 heures après le prélèvement.) Laver à l'eau distillée.

Incubation de 90 minutes à 37 °C dans un milieu préparé extemporanément à partir de quatre solutions stock : A, B, C, D.

— Solution A : solution tampon tris-maléate à pH 7,2.
— Solution B : solution aqueuse de sulfate de magnésium à 1,2 %.
— Solution C : solution aqueuse de nitrate de plomb à 2 %.
— Solution D : solution aqueuse d'ATP (adénosine 5', tri-phosphate disodium salt, $3H_2O$ crystalline Sigma Grade).

Ces solutions stock peuvent se conserver à 4 °C. Le milieu d'incubation est préparé en mélangeant :

5 ml de sol. A
2 ml de sol. B
0,75 ml de sol. C
2,5 ml de sol. D
Filtrer le milieu.

— laver à l'eau distillée après incubation puis plonger les lames pendant 15 secondes dans une solution diluée (1 pour 14 environ) de sulfure d'ammonium dans l'eau distillée;
— laver à l'eau distillée;
— colorer les noyaux au rouge neutre à 1 pour 100 pendant 5 minutes.

La positivité apparaît sous forme d'un précipité de couleur jaune-brun dans le cytoplasme des cellules. Leur noyau apparaît en rouge.

Nous avons seulement pratiqué cette réaction chez quatre de nos malades atteints de myélome, et ceci deux à trois mois après le début de la maladie pour les cas n° 21, 27 et 34, et quatre ans après le début pour le cas n°23. Aucun de ces quatre cas n'était sous traitement lors du prélèvement.

Il ne nous a pas été possible, malheureusement, d'effectuer cette réaction sur les plasmocytoses réactionnelles. Le témoin de la réussite de la réaction était la positivité des polynucléaires

éosinophiles du sang périphérique de sujets normaux dont les frottis ont été colorés en même temps.

Résultats

N° DES MALADES	PLASMOCYTOSE MEDULLAIRE	% DE PLASMOCYTES POSITIFS
N° 21	24 %	3 %
N° 23	42 %	0
N° 27	100 %	0
N° 34	81 %	0

Conclusion

Ce matériel, très insuffisant ne nous permet pas évidemment d'aboutir à des conclusions définitives. Nous nous bornons à constater que dans les trois cas, les assertions de Löffler et de Schubert se trouvent parfaitement confirmées : Il y a une diminution très considérable de l'activité d'adénosine triphosphatase dans les cellules du plasmocytome malin, et nous tenons vraisemblablement là, un élément de diagnostic différentiel très précieux dans l'étude des plasmocytoses inexpliquées médullaires et ganglionnaires, voire quelques plasmocytoses sanguines que l'hématologiste doit parfois discuter.

CHAPITRE III

DISCUSSION

Après avoir relaté les réactions cytochimiques que nous avons utilisées dans l'étude des cellules lymphoïdes (lymphocytes et plasmocytes) de sujets normaux ou atteints d'infection bénignes ou d'hémopathies lymphoïdes malignes, après avoir exposé les résultats de ces réactions, nous allons tenter d'apprécier ce qu'elles nous paraissent apporter au diagnostic et à la compréhension des hémopathies lymphoïdes. En fonction de ces premiers résultats, et avec beaucoup de prudence, du fait du nombre trop limité d'investigations, nous essayerons d'esquisser un protocole de travail ultérieur.

Nous allons examiner successivement pour les leucémies lymphocytaires et les plasmocytomes, l'apport : au diagnostic même de l'hémopathie maligne, éventuellement à la définition de son type cytologique, à l'appréciation de l'effet du traitement et au pronostic; enfin au mécanisme de ces désordres.

I. — Les leucémies lymphocytaires paraissent bénéficier des résultats de ces techniques, mais de façon modeste.

Pour le diagnostic même de la leucémie lymphocytaire, l'exagération de dépôt de glycogène paraît avoir une certaine valeur, bien mise en évidence par de nombreux travaux (90), (81), (4), (47), (11).

Cependant cette anomalie n'est ni constante ni spécifique. Dans notre petite série, elle manque complètement une fois. Surtout, elle n'est en rien spécifique. Elle peut être décelée au cours d'états infectieux (11), cependant ce fait est inconstant : Crowther (20) a étudié les lymphocytes de sang de patients soumis à différentes formes de stimulations antigémiques et leur a trouvé des scores de P.A.S. normaux, alors qu'il peut prouver que parmi ces lymphocytes se trouvent des cellules dont le métabolisme est très actif. Crowther (20) également, trouve des scores élevés de P.A.S. dans les lymphocytes de sujets atteints

d'épithéliomas divers, et il semble que ces scores s'élèvent sous l'effet de la progression de la maladie et peut-être sous l'effet du traitement. La même constatation a déjà faite au cours de la maladie de Hodgkin.

La répartition nucléolaire a un certain intérêt. L'augmentation nette des lymphocytes macronucléolaires paraît être fréquente : cependant elle n'est pas constante, et surtout la forte proportion habituellement constatée, de ces lymphocytes macronucléaire dans le sang normal rend les limites permettant le diagnostic, assez difficiles à saisir.

Que signifie sur une lymphocytose normale un taux de 85 % de lymphocytes macronucléolaire par exemple?

Il paraît surtout nécessaire de vérifier l'inversion de la formule nucléolaire qui a été signalée par différentes études, dans des états inflammatoires et tout spécialement dans la maladie de Hodgkin. Ce serait là un test différentiel précieux.

Les autres études ici pratiquées ne nous apportent rien; esterases non spécifiques, A.T.P.-ase, sont comme à la normale, négatives. Les deux déshydrogénases étudiés sont normales, ou oscillent autour de la normale, sans que l'on puisse tirer de leurs discrètes variations un argument diagnostique quelconque. Il est vrai que nous n'avons pas étudié l'oroticodesydrogenase qui peut-être aurait une plus grande valeur.

En conclusion, P.A.S. et aspect nucléolaire ont un intérêt pratique limité, mais certain, et ce, surtout dans les formes que l'on nommait jadis aleucémiques ou subleucemiques; trop nombreux sur un sang où les lymphocytes sont de nombre et d'aspect normaux, voilà un fait qui a une valeur d'orientation non négligeable. Tenter de reconnaître divers types de lymphocytes leucémiques est une entreprise déjà souvent tentée, sans grand succès. Actuellement, pour nous limiter aux données de la coloration de Giemsa on se borne à opposer une lymphose fréquente à petits lymphocytes plus ou moins typiques, et une lymphose rare à grands éléments pseudohistocytaires c'est ce qui en France est appelé classiquement la leucémie lymphocytaire de Touraine. Cette classification est hasardeuse et fragile, aucun argument sérieux ne vient l'étayer. D'autant, qu'au cours de l'évolution d'une même maladie, les aspects sont souvent quelque peu changeants.

La théorie de Good admise comme un dogme, peut-être un peu prématurement par certains, veut qu'il y ait deux variétés de lymphocytes, ceux qui sont dépendants du thymus ou ceux qui sont dépendants des formations équivalentes à la bourse de Fabricius. Mais l'étude morphologique ne permet en rien de distinguer ces deux variétés hypothétiques. Suivant la localisation dans le ganglion lymphoïde, Grundmann (39) nous l'avons vu, a proposé de séparer les lymphocytes du follicule de ceux du sinus. Leunert (65) propose de même une classification entre lymphocytes pulpaire et germinocytes.

Si l'on suivait ces auteurs, les leucémies lymphocytaires chroniques où les lymphocytes sont macronucléolaires, seraient habituellement des leucémies germinocytaires. Rien ne vient confirmer cette hypothèse.

Enfin le diagnostic différentiel entre leucémies lymphocytaires et lymphosarcomes n'est aidé en rien par les tests que nous venons d'étudier. Il est vrai que ce diagnostic nous a toujours paru une hypothèse d'école, et non un problème sérieux, le lymphosarcome est en général un lymphoblastosarcome aux cellules bien reconnaissables, et rien ne vient affirmer la légitimité de l'individualisation d'un lymphocytosarcome à cellules mûres.

Le taux du P.A.S. et, l'aspect nucléolaire n'étant pas modifié d'une façon constante et uniforme, il n'est guère possible, des anomalies constatées, de tirer un jugement permettant d'envisager l'évolutivité de la maladie, et la docilité possible au traitement.

Il serait certainement bon de pouvoir exercer au cours même de l'évolution de plusieurs cas soigneusement suivi, un contrôle régulier pour tenter d'apprécier l'apport de nos techniques sur les modifications des anomalies initialement constatés.

Il serait aussi possible de donner une valeur au sentiment des auteurs qui affirment voir décroître le taux du P.A.S. dans les lymphocytes des maladies en voie de stabilisation.

Nous ne pouvons apporter ici aucune opinion personnelle.

Quant aux renseignements d'ordre physiopathologiques, ils sont très grèles; l'interprétation de l'augmentation du glycogène dans ces lymphocytes leucémiques a fait l'objet de diverses théories. On a pu dire qu'il devait s'agir d'un caractère proprement leucémique ou préleucémique (Astaldi et Verga) (4), cette thèse ne tient pas. L'idée qu'il s'agit d'une augmentation d'activité métabolique normale (Mitus) (81) est séduisante. Elle peut trouver appui dans les constations devenues classiques faite au cours de l'évolution de lymphocytes stimulés par la phytohémagglutinine et en voie de transformation. (Cf. revue générale de Stobbe) (111). En effet dans ces lymphocytes, au début de leur transformation, du glycogène s'accumule et il va rester pendant la phase initiale de cette transformation.

Mais nous avons vu que Crowther (20) insiste sur le caractère inconstant de l'augmentation du P.A.S. dans les lymphocytes stimulés par différents agents; de plus cette hyperactivité supposée dans ces lymphocytes paresseux immuno-incompétents, fait plutôt penser à un vice du métabolisme plutôt qu'à une augmentation d'une activité vraie. Mais s'il s'agit d'un vice métabolique, sa définition biochimique n'est pas apportée et les conditions de son installation n'apparaissent pas clairement. Crowther pense que l'anomalie est liée à l'influence exercée par la croissance de la maladie tumorale sur les lymphocytes. C'est l'hypothèse qu'il retient dans les anomalies vues dans

les lymphocytes des épithéliomas; et il pense que le traitement perturbe encore le métabolisme de ces lymphocytes. Mais il n'apporte ni preuve ni explication.

Quant aux différents types de nucléoles, la signification de leur aspect normal étant inconnue, leur modification n'apporte pas de clarté sur la physiopathologie du processus leucémique.

II. — L'étude des plasmocytoses benignes et malignes bénéficiera peut-être d'avantage des données des réactions ici pratiquées. Le diagnostic de plasmocytome malin est en général aisé, cependant il est parfois délicat d'interpréter la signification d'une plasmocytose médullaire d'aspect normal et de taux modéré, et d'une plasmocytose sanguine discrète et d'aspect sans particularité. On connaît en effet un grand nombre de plasmocytoses réactionnelles à divers états inflammatoires, dont le taux de plasmocytes peut être assez abondant. La diminution franche de l'activité d'adénosine-truphosphatase, l'augmentation non moins franche de l'activité d'esterases non spécifiques, de phosphatases acides, auxquelles viendrait s'ajouter l'augmentation de la β glycuronidase et de la β acetylglycosaminidase paraissent des arguments vraiment sérieux pour ce diagnostic de plasmocytome.

Ces modifications peuvent manquer, leur absence n'élimine donc pas le diagnostic, mais jusqu'à présent elles n'ont jamais été constatées dans les plasmocytes satellites d'états inflammatoires. Avec Löffler et Schubert (68) on peut donc accorder à leur présence une grande valeur. La positivité du P.A.S. dans les plasmocytes de myelome est très inconstante et nous ne pouvons pas juger de sa valeur pour le diagnostic; quant aux deshydrogenases elles n'ont ici été étudiées que sur les documents bien insuffisants.

Ces deux dernières réactions nécessitent certainement des études complémentaires.

Le diagnostic du type cytologique du plasmocytome malin pose des problèmes qui n'ont pas leur solution encore. Une théorie déjà ancienne (Röhr, Moeschlin : Cf. livre de Begeman, p. 93) opposait le plasmocyte d'origine médullaire venu d'une petite cellule réticulaire lymphoïde et dont l'atteinte maligne déterminait la myelome classique, et le plasmocyte d'origine lymphatique, celui-là même dont la lignée avait été décrite par Moeschlin dans des adenopathies prélevés sur des ganglions de rubéole. Ces plasmocytes lymphatiques étaient sensés venir de la grande cellule réticulaire lymphoïde et suivre la filière proplasmoblaste, plasmoblaste, proplasmocyte, plasmocyte mûr. L'atteinte maligne de cette lignée lymphatique déterminait une hémopathie ganglionnaire et splenique avant tout, avec peu ou pas de lésion osseuse, une franche et précoce leucémie des éléments de cette lignée plasmocytaire avec évolution rapidement mortelle.

Cette théorie bien sûr ne trouve guère d'appui dans les travaux récents. Il reste que les deux types d'hémopathies malignes plasmocytaire ainsi définies paraissent bien exister et qu'il semble difficile de les confondre au moins dans une classification purement clinique (cf., article de Lortholary (P.), Levy (J.-P.), Najeau (Y.) (72).

Les observations du deuxième type sont rares. Il n'en figure pas d'exemple dans notre pratique récente.

La tentative d'isoler des types cytologiques de myelome en prenant pour guide les secrétions d'immunoglobulines diverses, paraît plus sérieuse, mais elle n'a donné jusqu'ici que des résultats limités; plamocytes flammés, et inclusions nucléaires seraient plus fréquents dans le γ A myelome (cf. livre récent de Waldenström : Myeloma, 1970). Cependant ces aspects ne sont ni constants, ni spécifiques, ni sur l'évolution de la maladie, ni sur la docilité au traitement, les documents de la littérature cytochimique et les notions tirées de nos examens ici rapportés, ne permettant d'estimer si ces anomalies ont quelque valeur pour prévoir l'évolution et guider la thérapeutique. Cette notion sera sans doute difficile à dégager, car la maladie myélomateuse est assez capricieuse quant à sa traduction cytologique. Cependant nous nous efforcerons de la préciser.

Enfin ces désordres enzymatiques précieux pour le diagnostic n'ont pas reçu encore une explication biochimique cohérente qui donnerait des lumières sur les anomalies profondes de ces plasmocytes malins.

III. — Nous ne voulons pas discuter ici les anomalies de la maladie de Waldenström; en effet le seul cas retenu dans notre très courte série n'offre pas de particularité notable. Il est évident que cette affection où la cellule atteinte et ses anomalies font l'objet de discussions difficiles, mérite d'être étudiée attentivement par nos techniques. C'est pourquoi nous nous proposons maintenant de continuer ces travaux préliminaires en les complétant, en les enrichissant par l'utilisation de nouvelles techniques : β glycuronidase par exemple, et surtout par l'établissement d'un protocole de surveillance régulière de ces lymphoses et plasmocytomes qui nous permettra de déceler quelques particularités intéressantes dans l'histoire naturelle de ces hémopathies lymphoïdes.

CHAPITRE IV

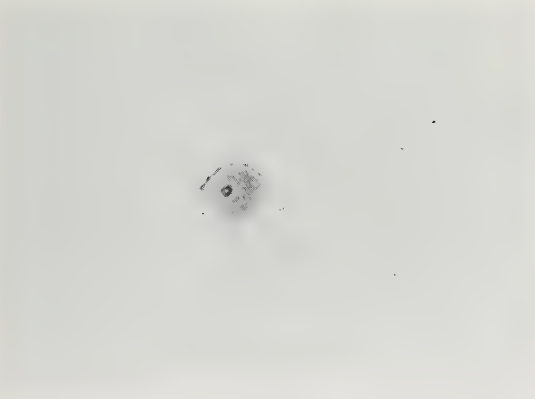
CONCLUSION

Après une brève revue des réactions cytochimiques les plus usuelles en cytologie hématologique, et de leur apport dans la reconnaissance des cellules normales et dans le diagnostic des hémopathies myeloïdes, nous rapportons ici les résultats d'études préliminaires qui ont en vue de tenter d'apprécier la valeur pratique de quelques investigations cytochimiques habituellement peu utilisées dans l'étude des cellules lymphoïdes, lymphocytes et plasmocytes. Les réactions utilisées ont comporté la coloration par le P.A.S. l'étude de la morphologie nucléolaire par la méthode de Smetana, l'appréciation de l'activité de diverses enzymes : estérases non spécifiques, phosphatases acides, adénosines triphosphatases, lactico et succinodéshydrogénases.

Les résultats obtenus sur cette première série de témoins et de malades atteints de diverses hémopathies lymphoïdes, nous permettent les conclusions suivantes :

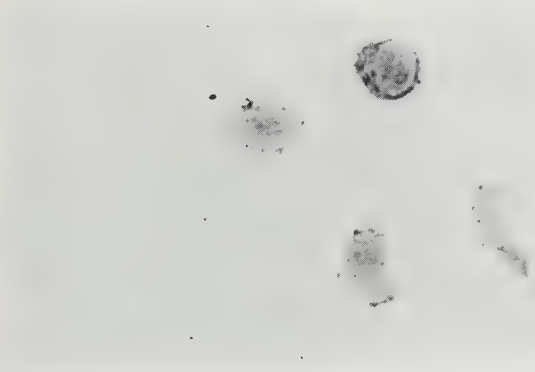
1) Dans l'étude des lymphocytes de leucémies lymphocytaires chroniques, la coloration par le P.A.S. révélant le glycogène, et la détermination de l'aspect nucléolaire ont un intérêt certain dans le diagnostic des formes atypiques.

2) Dans l'étude des plasmocytoses, la détermination des activités enzymatiques suivantes : adénosine trophosphatase, estérases non spécifiques, phosphatases acides représentent certainement un apport précieux pour le diagnostic; l'adénosine triphosphatase franchement diminuée et les autres activités augmentées semblent jusqu'à maintenant être particulières aux plasmocytes des plasmocytomes malins.



1

Nº 1. — Coloration nucléaire montrant un macronucléole « ring-like » dans un lymphocyte du sang de LLC.



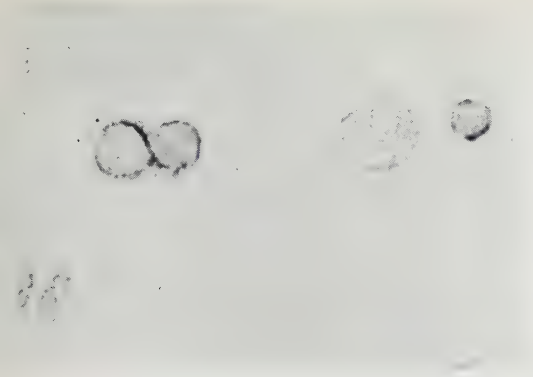
2

Nº 2. — Coloration nucléaire sur des lymphocytes de LLC. (Sang). Présence de macronucléole dans la cellule du haut et de plusieurs micronucléoles dans la cellule du bas.

3

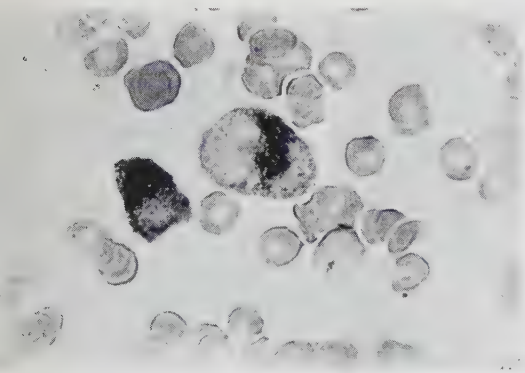
Nº 3. — Coloration nucléolaire sur un plasmocyte jeune de myelome mettant en évidence un gros nucléole compact. (Moelle.) Le noyau du lymphocyte contient des micronucléoles.

Nous avons utilisé pour toutes les photos un objectif à immersion × 100

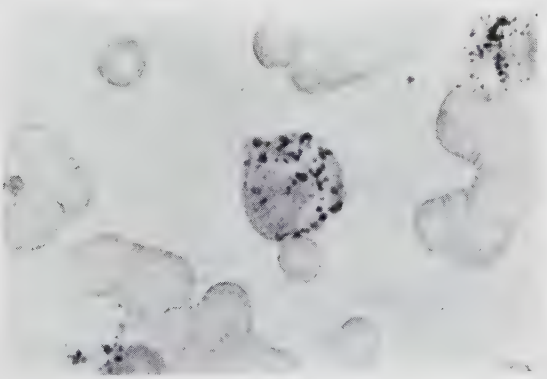


Nº 4. — Lacticodeshydrogenase (score ++) dans deux lymphocytes de LLC (cellules à gauche du champ). Polynucléaire de score 0 (cellule en bas du champ).

Nº 5. — Lacticodeshydrogenase (score +++) dans un plasmocyte de myelome. Lymphocyte à l'extrême droite du champ (score ++).



Nº 6. — Esterase α naphtyl Acetate dans deux plasmocytes de myelome (score +++).



Nº 7. — Phosphatases acides dans un plasmocyte de myelome (score +++).

RÉFÉRENCES

(1) Ackerman (G. A.). — Histochemical demonstration of dehydrogenase activity in the cells of normal human blood and bone marrow. *J. biophys. biochem., cytol,* 1960, **8**, 61.

(2) Astaldi (G.), Micu (D.). — Cytochemical investigation on normal and pathologic lymph nodes. *Rev. Roum. Med. Int.*, 1967, **4**, 247.

(3) Astaldi (G.), Stroselli (E.), Sauli (S.). — Histochemical research on erythroblasts P.A.S. positivity under various pathological conditions. Proc. 9th Cong. Europ. Soc. Haemat. Lisbon 1963, **2,** 86, S. Karger (ed), Bâle, New York.

(4) Astaldi (G.), Varga (L.). — The glycogen content of the cells of lymphatic leukemia. *Acta Hemat.*, 1957, **17**, 129.

(5) Baillif (R. N.), Kimborough (C.). — Studies on leucocytes granules after staining with soudan Black B and MG.G.. *J. Lab. clin. Med.*, 1947, **32**, 155.

(6) Balogh (K.), Cohen (R. B.). — Histochemical demonstration of diaphorases and dehydrogenases in normal human leucocytes and platelets. *Blood,* 1961, **17**, 491.

(7) Basch (A.). — A propos de 42 observations de macroglobulinemie de Waldenström. Thèse Paris, 1966.

(8) Begemann (H.). — Klinische Hämatologie 1969. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1969.

(9) Begemann (H.), Rastetter (J.), Fink (V.). — Zur Klassifizierung der Lymphozyten. *Med. Klin.* 1963, **58**, 706.

(10) Bessis (M.). — "Cytologie of the blood and blood-forming organs" Grune and Stratton (ed) New York, 1956.

(11) Bjonberg (O.). — Cytochemical studies on glycogen content of lymphocytes in lymphatic leukemia and reactive lymphocytosis. *Acta Medica Scand.*, 1963, **173**, 451.

(12) Bloom (M. L.), Wislocki (G. B.). — The localization of lipids in human blood and bone marrow cells. *Blood,* 1950, **5**, 79.

(13) Bohn (L.). — Histochemical demonstration of lactate dehydrogenase in cells in blood films. *Scandin. J. Hemat.*, 1965, **2**, 117.

(14) Bonhomme (J.). — Leucémies aiguës à « monocytes ». Etude cytologique et cytochimique de 25 cas. Thèse Paris, 1966.

(15) Bottomley (R.H.), Locke (S.J.), Ingram (H.C.). — Lactic-dehydrogenase of human chronic lymphocytic leukemic leukocytes. *Blood,* 1966, **27**, 85.

(16) Braunsteiner (H.), Schmalzl (F.). — Etude cytochimique des monocytes — Mise en évidence d'une esterase caractéristique. *Nouv. Rev. fr. Hémat,* 1968, **8**, 289.

(17) Burstone (M.S.). — Enzyme Histochemistry : its applications in the study of neoplasm. *Academic Press New York,* 1962.

(18) Castoldi (G. L.), Yam (L. T.), Mitus (W. J.). — Cytochemical demonstration of dihydro-orotic dehydrogenase, in blood and bone marrow cells. *Acta Haemat.,* 1968, **39**, 203.

(19) Chason (J. L.), Pearse (A. G. E.). — PSM and nicotinamide in the histochemical demonstration of dehydrogenase in rat brain. *J. Neurochem.,* 1961, **6**, 259.

(20) Crowther (D.), Hamilton (G.), Ferley Serwell (R. L.). — The periodic Acid Schiff Reaction of lymphocytes in human malignant diseases. *Brit J. Haemat.,* 1969, **16**, 4.

(21) Dacie (J. V.). — Practical Haematologie, 1950. London Churchill.

(22) Dempsey (E. W.), Wislocki (G. B.). — The occurence of the P.A.S. reaction in various normal cells of blood and connective tissue. *Blood,* 1949, **4**, 562.

(23) Farber (E.), Louviere (C. D.). — "Histochemical localisation of specific oxydatives Enzymes" VI Solubles oxydation-reduction dyes as aids in the histochemical localisation of oxydative enzymes with tetrazolium salts. *J. Histochem. Cytochem.,* 1956, **4**, 347.

(24) Farber (E.), Sternberg (W. H.), Dunlap (C. E.). — "Histochemical localisation of specific oxydatives enzyme" III Evaluation studies of tetrazolium staining methods for DPN diaphorase and succinic dehydrogenase system. *J. Histochem. Cytochem.,* 1956.

(25) Fessas (P.), Papayannopoulou (T.). — Cytochemical observations on β thalassemia I. The P.A.S. positive substance of Erythroblasts. *Acta Haemat.,* 1965, **34**, 1.

(26) Gardais (J.). — "Cytochimie des cellules lymphoïdes pathologiques et des lymphocytes en culture." Mémoire pour l'obtention du certificat d'hématol. supérieure de Paris, 1969.

(27) Gibb (R. P.), Stowell (R. E.). — Glycogen in human blood. *Blood,* 1949, **4**, 569.

(28) Golberg (A. F.), Barka (T.). — Acid phosphatase activity in human blood cells. *Nature,* 1962, **195**, 297.

(29) Gomori (G.). — Microscopic histochemistry. University of Chicago Press, Chicago III, 1952.

(30) Gomori (G.). — Distribution of Acid phosphatase in the tissue under normal and pathologic conditions. *Arch. Path.,* 1941, **32**, 189.

(31) Gonzalez-Guzman (I.). — Contribution à la reconnaissance de l'appareil nucléolaire des cellules leucémiques. *Sang*, 1949, **20**, 225.

(32) Gough (J.), Elves (M. W.). — Studies of lymphocytes and their derivative cells in vitro. II Enzyme histochemistry. *Acta hematol.* (Basel) 1967, **37**, 42.

(33) Grozdea (J.), Colombies (P.), Ducos (J.), Bierme (R.). — Etude cytochimique de 20 cas de leucose de la lignée lymphoïde. *La Presse médicale* (27 mai) 1967, **26**, 75.

(34) Grozdea (J.), Colombies (P.), Boissezon (J. F.), Ducos (J.). — Etude cytochimique dans 18 cas de maladie de Kahler. *La Presse médicale* (11 janv.) 1969, **3**, 54.

(35) Grozdea (J.), Colombies (P.), Ducos (J.). — Etude comparative du P.A.S. au niveau de la lignée rouge chez 187 sujets normaux ou atteints d'hémopathies. *Rev. Fr. Etud. clin. Biol.* 1968, **13**, 190.

(36) Grozdea (J.), Colombies (P.), Ducos (J.). — Etude cytochimique et chromosomes en dehors des hémopathies. *Nouv. Rev. fr. Hemat.*, 1969, **9**, 722.

(37) Grozdea (J.), Colombies (P.), Ducos (J.). — Etude des péroxydases des leucocytes du sang périphérique et de la moelle osseuse chez 20 malades atteints de leucémie aiguë ou chronique de la série granulocytaire. *Rev. Fr. Etud. clin. et biol.* 1967, **12**, 180.

(38) Graumann (W.). — « Ergebnisse der Polysaccharid » Histochemie : Mensch und Säugetiere in Handbuch der Histochemie. Herausgeb W. Graumann K. Neumann. Bd II, Teil 2, Berlin Göttingen-Heidelberg, 1964.

(39) Grundmann (E.). — Cytologische Untersuchungen über Formen und Orte der Lymphocytenreifung bei der Ratte. *Vehr. Dtsch. Ges. Path.* 1958, **41**, 261.

(40) Hashimoto (T.), Kaluza (Js.), Burstone (M. S.). — The effect of menadione and phenazine methosulfate on the tetrazolium reduction system under histochemical conditions. *J. Histochem. Cytochem.*, 1964, **12**, 797.

(41) Hayhoe (F. G. S.), Quaglino (D.). — Cytochemical demonstration and measurement of leukocyte alkaline phosphatase activity in normal and pathological states by a modified axodye coupling technique. *Brit. J. Haemat.*, 1958, **4**, 375.

(42) Hayhoe (F. G. S.), Quaglino (D.), Flemans (R. J.). — Consecutive use of Romanovsky and Periodic acid schiff techniques in the study of blood and bone marrow cells. *Brit. J. Haemat.*, 1960, **6**, 23.

(43) Hayhoe (F. G. J.), Quaglino (D.), Doll (R.). — The cytology and cytochemistry of acute leukaemias, London Her Majesty's Stationnery Office., 1964.

(44) Hayhoe (F. G. J.), Quaglino (D.). — Refractory sideroblastic anemia and erythraemic myelosis : possible relationship and cytochemical observations. *Brit. J. Haemat*, 1960, **6**, 386.

(45) Hayhoe (F. G. J.). — The cytochemistry of hemopoïesis." In disorders of the blood, 1963, 131. Whitby L.E.M. and Britton

C J C, Ed. New York Grune and Stratton.

(46) Heckner (F.), Strufe (R.). — Cytochemischer Polysaccharidnachweis mit Natriumperjodat. *Klin. Wschr.*, 1956, **34**, 326.

(47) Heckner (F.). — Polysaccharide in Blut und Knochenmarkzellen in : Merker (H) Ed. : Zyto-und Histochemie in der Hämatologie. Berlin Göttingen-Heidelberg Springer, 1963.

(48) Heilmeyer (L.). — Handbuch der Hämatologie. Bd II, 1959. Heilmeyer (L.), Hittmair (A.), Ed. Berlin Göttingen-Heidelberg.

(49) Henon (Ph.). — Essai d'interprétation de la coloration par le P.A.S. des lymphocytes de leucémies lymphocytaires chroniques. Etude sur 25 cas, thèse Méd., Paris, 1968, 13.

(50) Hoenel (V.). — Veränderungen der nucleolar Substanz und Knochenmark bei pernicioser Anämie und ihre pathogenetische Bedeutung. *Helv. Med. Acta*, 1951, **17**, 627.

(51) Hoffmann (G. T.), Rottino (A.), Stern (K. G.). — Demonstration of the Nadi-réaction of cytochrome oxidase activity in cell lymphoïd and myeloïd series, obtained from normal individuals and patients suffering from Hodgkin's and other diseases. *Blood*, 1951, **6**, 1051.

(52) Hui Chun Yiu. — Uber den Glykogengehalt der Blutzellen bei myeloproliferativen Erkrankungen mit besonderer Berücksichtigung der alkalischen Phosphatase, 1962, Inaug-Diss-Freiburg.

(53) Hule (V.). — Lactate dehydrogenase iso-enzyme patterns of human lymphatic and myeloid leukemic leukocytes. *Clin. Chim. Acta*, 1967, **17**, 349.

(54) Iwao Hirono. — Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase in ascites Tumor cells. *Stain Technology*, 1957, **32**, 39.

(55) Jones (R. V.), Goffi (G. P.), Hutt (M. S. R.). — Lymphocyte glycogen content in various diseases. *J. clin. Path.* 1962, **15**, 36.

(56) Kaplow (L. S.). — An histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and bone marrow. *Blood*, 1955, **10**, 1023.

(57) Kaplow (L. S.). — Simplified myeloperoxidase staining using benzidine dihydrochloride. *Blood*, 1955, **26**, 215.

(58) Kaplow (L. S.). — Leukocyte alkaline phosphatase cytochemistry: applications and methods. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1968, **155**, 911.

(59) Kaplow (L. S.), Burstone (M. S. R.). — Acid buffered acetone as a fixative for enzyme cytochemistry. *Nature*, 1963, **200**, 690.

(60) Kaplow (L. S.). Burstone (M. S.). — Cytochemical demonstration of acid phosphatase in hematopoïetic cells in health and in various hematological disorders using Azo dye technics. *J. Histochem. Cytochem.*, 1964, **12**, 805.

(61) Kashiwada (N.). — A morphological study on nucleolus of leukemia and malignant lymphoma cells. *Acta hemat. Japon.*, 1968, **31**, 1017.

(62) Leder (L. D.). — Der Blutmonocyt. Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik. Band 23. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1967.

(63) Lejeune (F.). — Techniques cytologiques utiles en pratique courante in : Cytologie pratique du sang et des organes hématopoïetiques, Levy (J.P.) et Lortholary (P.). 1 vol. Doin Derein et Cie (éd.), Paris, 1966, 124.

(64) Lejeune (F.), Mielot (F.). — Etude cytochimique de frottis et empreintes ganglionnaires in : Actualités hématologiques, Série I, Masson et Cie (éd.), 1967.

(65) Lennert (K.). — Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, Band I, Teil 3. Springer Verlag, 1961, Berlin Göttingen-Heidelberg.

(66) Lison (L.). — Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes, Paris, 1953. Gauthier-Villars, éd.

(67) Löffler (H.). — Unspezifische Esterasen und saure Phosphatase bei Plasmozytomen. *Blut,* 1967, **15**, 330.

(68) Löffler (H.), Schubert (J. C. F.). — Cytochemische Unterschiede zwischen Plasmazellen und Myelomzellen. *Klin Wschr,* 1963, **41**, 484.

(69) Löffler (H.). — Zur Differenzierung unreifzelliger (akuter) Leukosen mit cytochemischen Methoden. *Folia Haemat. N.F.*, 1963, **8**, 112.

(70) Löffler (H.), Berghoff (W.). — Eine Methode zum Nachweis von saurer Phosphatase in Austrichen. *Klin. Wschr.*, 1962, **40**, 363.

(71) Lortholary (P.), Lejeune (F.), Tanzer (J.), Mielot (F.), Boiron (M.), Bernard (J.), — Etude cytochimique des leucoblastes au cours de la transformation aiguë de la leucémie myéloïde chronique. *Presse médicale,* 1966, **74**, 1237.

(72) Lortholary (P.), Levy (J. P.), Najean (Y.). — Deux observations de réticulome plasmocytaire. *Nouv. Rev. Fr. hémat,* 1964, **4**, 447.

(73) Love (R.). — Improved staining of the nucleoproteins of the nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, **10**, 227.

(74) Love (R.), Liles (R.H.). — Differentiation of nucleoproteins by inactivation of proteinbound aminogroups and staining with toluidine blue and ammonium molybdate. *J. Histochem Cytochem.*, 1959, **7**, 164.

(75) MacManus (J. F. A.). — Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature,* London, 1946, **158**, 202.

(76) Mahr (G.). — Der cytochemische Nachweis der zell Dehydrogenasen des Blutes. *Acta haemat. Basel,* 1962, **27**, 54.

(77) Marcuse (P. M.), Cochran (J.). — Staining of leucocytes by the tetrazolium method : correlation of results with the leucocyte count and with the clinical classification. *Blood,* 1961, **17**, 738.

(78) Melnick (P.J.). — Histochemical enzymology of leukemic cells in : Pathology of leukemia, 1968. Amromin (G.D.), Hoeber ed.

(79) Mercker (H.). — Cytochemie der Blutzellen in : Handbuch der inneren Medizin, Band II : Blut und Blutkrankheiten, 5 Auflage. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg N.Y., 1968.

(80) Mielot (P.), Lejeune (F.). — Diagnostic cytologique et cytochimique des cellules leucémiques. *Path. Biol.*, 1968, **16**, 227.

(81) Mitus (W. J.), Bergna (L. J.), Mednicoff (J. B.), Dameshek (W.). — Cytochemical studies of glycogen content of lymphocytes in lymphocytic proliferation. *Blood*, 1958, **13**, 748.

(82) Moretti (G.), Veyret (V.), Broustet (A.). — Etude par le P.A.S. des lymphocytes du sang périphérique dans la maladie de Waldenström et la trypanosomiase africaine. *Nouv. Rev. Fr. hémat.*, 1969, **9**, 741.

(83) Najman (A.), Sonsino (E.). Buu-Hoï (A.), Duhamel (G.), André (R.). — La coloration par le P.A.S. des lymphocytes dans la leucémie lymphoïde chronique. Confrontation avec la culture de lymphocytes. *Nouv. Rev. Fr. hémat.*, 1969, **9**, 737.

(84) Novikoff (A. B.), Masek (B.). — Survival of lactic dehydrogenase and PPNH-diaphorase activities after formol calcium fixation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1958, **6**, 217.

(85) Peacock (A. A.), Brecher (G.), Highsmith (E. M.). — A simplified procedure for quantitative measurement of alkaline phosphatase in white blood cells. *J. clin. Path.*, 1958, **29**, 80.

(86) Percheron (F.), Paquin (R.). — Sur la spécificité de la réaction à l'acide périodique fuschine de Schiff appliquée à la révélation des glycoprotéines. *Bull. Soc. chim. Bio.*, 1961, **43**, 397.

(87) Perls (M.). — Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Virchows Arch. path. Anat.*, 1867, **39**, 42.

(88) Pittaluga (G.), Bessis (M.). — Sur la structure des nucléoles de la cellule normale et pathologique. *Bull. Histol. Appli.*, 1944, **2**, 23.

(89) Quaglino (D.), Flemans (R.). — Peroxidase staining in leucocytes. *Lancet*, 1958, **2**, 1020.

(90) Quaglino (D.), Hayhoe (F. G. J.). — Observations on the periodic acid schiff reaction in lymphoproliferative diseases. *J. Path. Bact.*, 1959, **78**, 521.

(91) Quaglino (D.), Hayhoe (F. G. J.). — Acetone fixation for the cytochemical demonstration of dehydrogenases in blood and bone marrow cells. *Nature* (London), 1960, **187**, 85.

(92) Rheingold (J. J.), Wislocki (G. B.). — Histochemical methods applied to hematology. *Blood*, 1948, **3**, 641.

(93) Röhr (K.). — Das menschliche Knochenmark. Stuttgart : Georg Thieme, 1960.

(94) Roodyn (D.B.) Ed. — Enzyme cytology. Acad. Press, New York, 1967.

(95) Rosenszajn (L.), Marshak (G.) et al. — Acid phosphatase activity in normal human blood and bone marrow cells as demonstrated by the azodye method. *Acta haemat.*, 1963, **30**, 310.

(96) Salsbury (A.J.). — Nucleolar staining in the differentiation of acute leukaemias. *Brit. J. Hemat.*, 1967, **13**, 768.

(97) Scarpelli (D. G.), Pearse (A. G. E.). — Physical and chemical protection of cell constituents and the precise localization of enzymes. *J. Histochem. Cytochem*, 1958, **6**, 369.

(98) Schubert (J.C.F.), Rinneberg (H.). — Der cytochemische Nachweis der Adenosintriphosphatase bei pH 7,2 in eosinophilen Granulocyten und Plasmazellen des menschlichen Knochenmarkes. *Folia Haemat. N.F.*, 1961, **6**, 1.

(99) Schubert (J. C. F.), Schubert (H.). — Die zitologische Diagnose des Plasmozytoms am Knochenmarkausstrich mit Hilfe der Adenosintriphosphatase Reaktion. *Blut*, 1969, **19**.

(100) Seligman (A. M.), Rutenberg (A. M.). — The histochemical demonstration of succinic-dehydrogenase. *Science*, 1951, **113**, 317.

(101) Sheehan (H. L.), Storey (G. W.). — An improved method of staining leucocyte granules with Sudan Black B. *J. Path. Bact.*, 1947, **59**, 336.

(102) Smetana (K.), Freireich (E. J.), Busch (H.). — Chromatin structures in ring shaped nucleoli of human lymphocytes. *Exp. Cell. Res.*, 1968, **52**, 112.

(103) Smetana (K.), Lane (M.), Busch (H.). — Studies on nucleoli of leukemic agranulocytes and plasmacytes in multiple myeloma. *Exp. mol. Path.*, 1966, **5**, 236.

(104) Smetana (K.). — A further contribution to the question of the incidence of nucleoli in the nuclei of nature lymphocytes in man. *Folia Biol.*, 1961, **7**, 268.

(105) Smetana (K.), Hermansky (F.), Pössnerova (V.). — Nucleolar coefficient and glycogen content of lymphocytes in chronic lymphadenoses. *Neoplasma*, 1962, **9**, 549.

(106) Schmalzl (F.), Braunsteiner (H.). — Zytochemische Untersuchungen zur Entwicklung der grossen mononuklären Zellen des Hautfensters. *Acta Haemat*, 1967, **38**, 281.

(107) Schmalzl (F.), Braunsteiner (H.). — On the origine of monocytes. *Acta Haemat*, 1969, **39**, 177.

(108) Souza (de E. J.), Kothare (S. N.). — A method for the cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase in human leucocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, 1959, **7**, 77.

(109) Starkweather (W.), Spencer (H. H.), Schock (H. K.). — The lactate dehydrogenase of hemopoïetic cells. *Blood*, 1966, **28**, 860.

(110) Stokinger (L.), Kellner (G.). — Der lymphocyten Nucleolus : die Darstellung und Bedeutung des Nucleolus. Wiener Z. inn Med., 1962, **35**, 135.

(111) Stobbe (H.). — Zur Diagnostik der Monocytenleukämie (1960) Proc. 7th Congr. Europ. Soc. Haemat. London, 1959, Part 11, 256.

(112) Stuart (J.), Skowron (P. N.). — Marrow Enzymes in megaloblastic anemia. *Brit. J. Haemat.*, 1968, **15**, 443.

(113) Sundberg (R. D.), Broman (H.). — The application of the Prussian blue stain to previously stained films of blood bone marrow. *Blood*, 1955, **10**, 160.

(114) Szmigielski (S.), Litwin (J.), Zupanska (B.). — Cytoenzymatical differentiation of normal and neoplastic plasma cells. *J. clin. Path.*, 1963, **18**, 345.

(115) Tanzer (J.), Lortholary (P.), Lejeune (F.), Hampe (A.), Boiron (M.), Bernard (J.). — Intérêt des techniques cytochimiques pour l'étude des modifications de l'équipement enzymatique des leucocytes au cours des leucémies. *Nouv. Rev. Fr. Hémat.*, 1966, **6**, 317.

(116) Tsou (K. C.), Cheng (G. S.), Nachlas (M. M.), Seligman (A. M.). — Synthesis of some p. nitro-phenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 6139.

(117) Undritz (E.). — The peroxydase reactions and their practical significance. Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat., Lisbon., Karger-Bâle, New York, 1963, **2**, 192.

(118) Undritz (E.). — Atlas of haematology. Sandoz. Basel. 1952.

(119) Wachstein (M.). — The distribution of histochemically demonstrable glycogen in human blood and bone marrow cells. *Blood*, 1949, **4**, 54.

(120) Wachstein (M.). — Alcaline phosphatase activity in normal and abnormal human blood and bone marrow cells. *J. Lab. clin. Med.*, 1946, **31**, 1.

(121) Wachstein (M.), Wolf (G.). — The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears. *J. Cytochem. Histochem.*, 1958, **6**, 457.

(122) Wachstein (M.), Meisel (E.). — Histochemistry of hepatic phophatases at a physiological pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Amer J. clin. Path.*, 1957, **27**, 13.

(123) Wegman (R.), Caridroit (M.). — Activités des succino-deshydrogenases dans certaines fractions cellulaires. *Ann. d'histochim.*, 1958, **3**, 1930.

(124) Zittoun (R.), Smadja (R.), Guillerm (M.), Bousser (J.). — La coloration par le P.A.S. du lymphocyte normal et leucémique. *Path. et Biol.*, 1967, **15**, 508.

Vu, le Président de Thèse
Pr. J. DUCOS

Vu, le Doyen de la Faculté
Pr. G. LAZORTHES

Vu et permis d'imprimer le 21 septembre 1970
le Recteur de l'Académie de Toulouse,
C. CHALIN

Ets Busson, impr., Paris — Dépôt légal : 4e trim. 1970, no 5 129